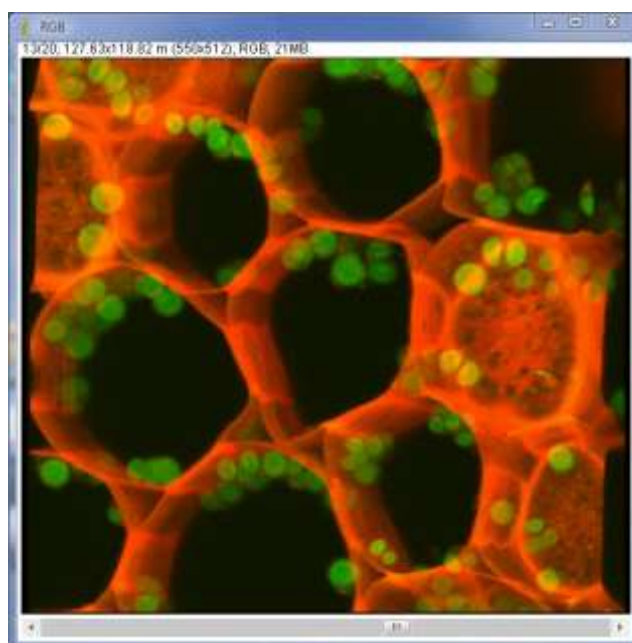


Manual de Usuario del programa Confocal Uniovi ImageJ

(Versión 1.3)



*Ángel Martínez Nistal
Marta Alonso Guervós*

SERVICIOS CIENTÍFICO-TÉCNICOS
Servicio de Microscopía Fotónica y Proceso de Imágenes.

INDICE:

INTRODUCCIÓN.	1
INSTALACIÓN.	1
FUNCIONAMIENTO.	5
LEER IMAGEN DEL CONFOCAL LEICA.....	5
LEER IMAGEN DE CUALQUIER MICROSCOPIO (BIOFORMATO)	8
SALVAR TIFF	10
CERRAR IMÁGENES.....	11
DUPLICAR IMAGEN.....	11
ESCALAR IMAGEN.....	13
SELECCIONAR ROI	14
CALIBRAR IMAGEN.	15
PINTAR BARRA DE ESCALA.....	17
ZOOM	19
CARGAR LUT	20
ANIMAR SERIES	20
SEPARAR BANDAS COLOR.....	23
MEZCLAR BANDAS COLOR.....	23
AJUSTAR NIVEL GRIS	24
SEGMENTACIÓN	25
HISTOGRAMA INTERACTIVO	27
PROYECCIÓN Z	28
PROYECCIÓN 3D.....	29
SECCIONES ORTOGONALES.....	30
PAR ESTEREOSCÓPICO.....	32
VISOR DE IMÁGENES 3D.....	33
PEGAR IMÁGENES	37
REALIZAR MONTAJE	39
<i>Herramientas de "Montaje"</i>	39
<i>Herramientas de "Dibujo"</i>	44
<i>Herramientas de "Opciones"</i>	45
II.....	47
REFERENCIAS:	48

Introducción.

ConfocalUniovi ImageJ es una compilación del programa ImageJ con una serie de funciones y “plugins” orientadas al trabajo con imágenes de Microscopía Confocal. Inicialmente dirigido a visualizar y procesar imágenes obtenidas con el Microscopio Confocal Leica TCS SP2 AOBS, a partir de la versión 1.3 permite trabajar con múltiples formatos de imágenes de microscopios confocales (Leica, Zeiss, Nikon, Olympus, etc.).

ImageJ es un programa de proceso y análisis de imágenes de dominio público (“open source”), realizado en lenguaje Java. Su author, Wayne Rasband (1) trabaja en el Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA. Existen versiones del programa para Windows, Mac y Linux.

Con el paso de los años el programa se ha visto complementado por un creciente número de “plugins” y macros, desarrolladas por un gran número de colaboradores. Estos plugins se pueden añadir a conveniencia al programa original. Toda la información sobre ImageJ se puede encontrar en: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

En **ConfocalUniovi ImageJ** se han agrupado, junto al programa ImageJ, una serie de “plugins” de gran utilidad para el proceso de imágenes de confocal. Todas las funciones del programa se agrupan en una interface gráfica con un conjunto de botones que facilitan su utilización por los usuarios.

Instalación.

ConfocalUniovi ImageJ incluye la versión para Windows de ImageJ . Para su instalación se necesita un ordenador con Windows 2000, XP , Vista o 7, con 512 Mb de RAM.

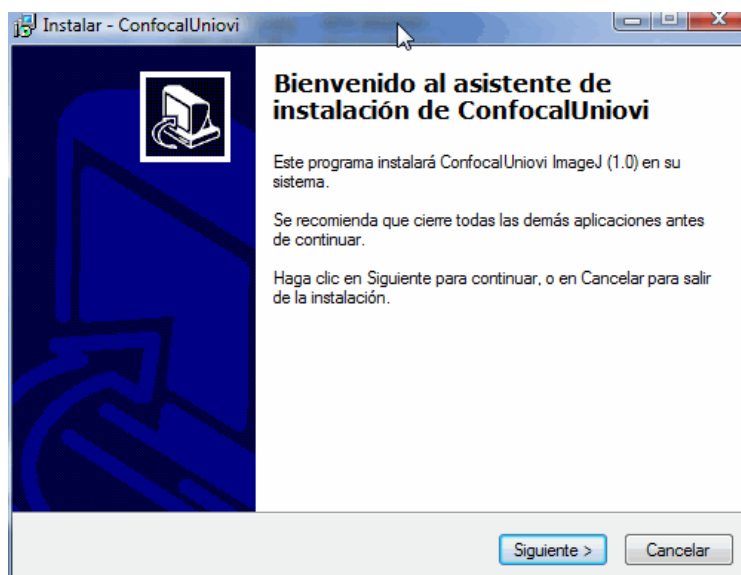
Existe versión tanto para Windows 32 bits como para 64 bits. Se recomienda instalar la versión de 64 bits en aquellos ordenadores que cuenten con este sistema operativo.

Se puede descargar de la página web del Servicio de Proceso de Imágenes de la Universidad de Oviedo :

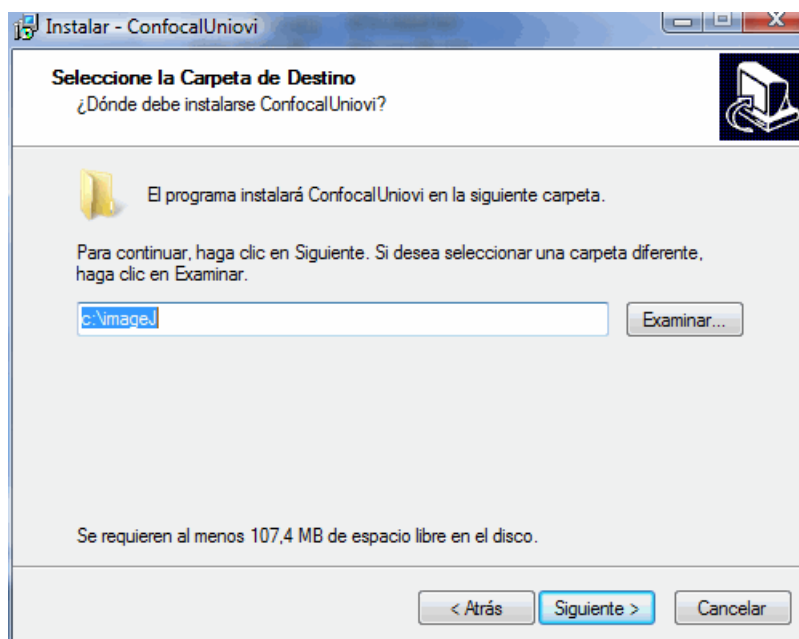
http://www.sct.uniovi.es/index.php?option=com_content&task=view&id=224&Itemid=145

Una vez descargado el fichero “setup_Confocal_Uniovi_ImageJ.exe”, lo ejecutaremos y comenzará su instalación.

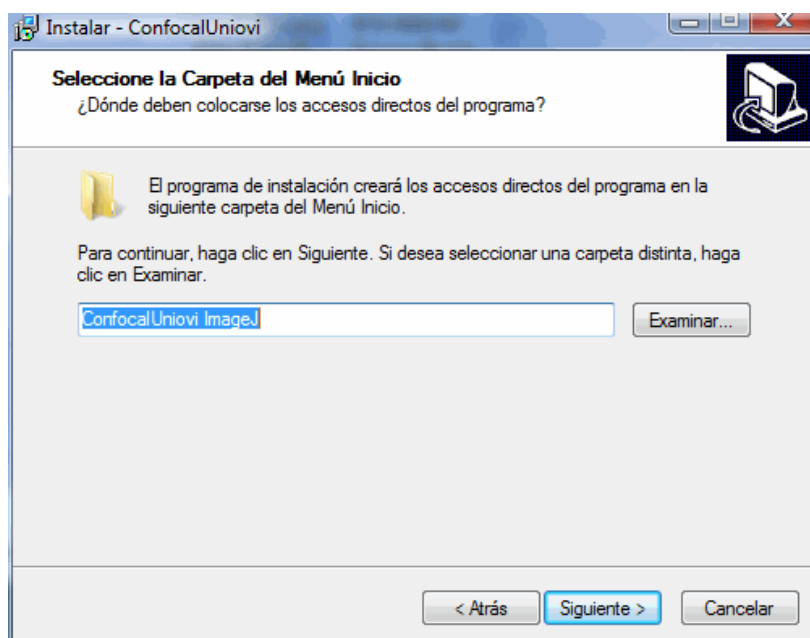
Nos aparece la pantalla siguiente:



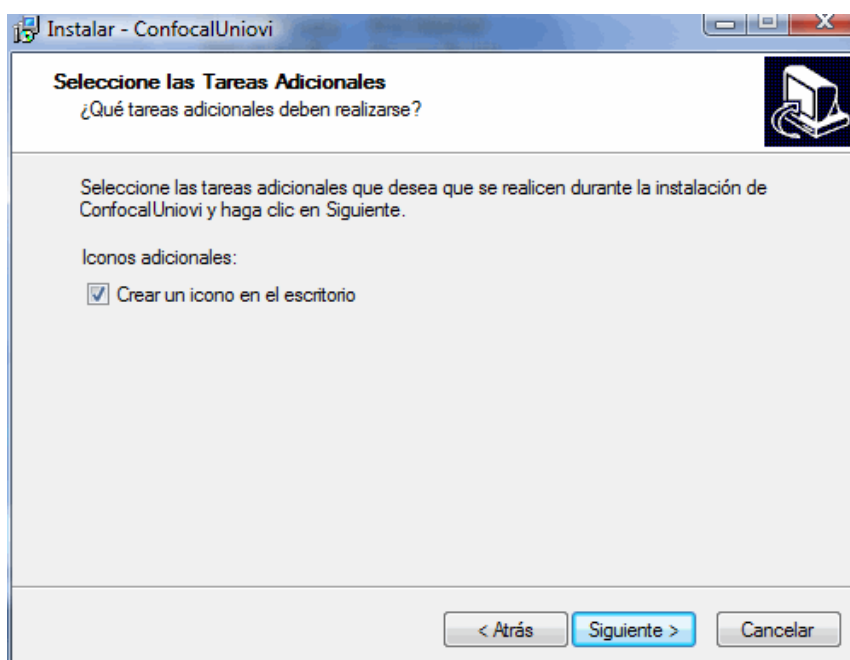
Pulsaremos “siguiente” y nos preguntará por el directorio de instalación. Dejaremos el que nos aparece por defecto que será c:\imageJ y pulsaremos “siguiente”



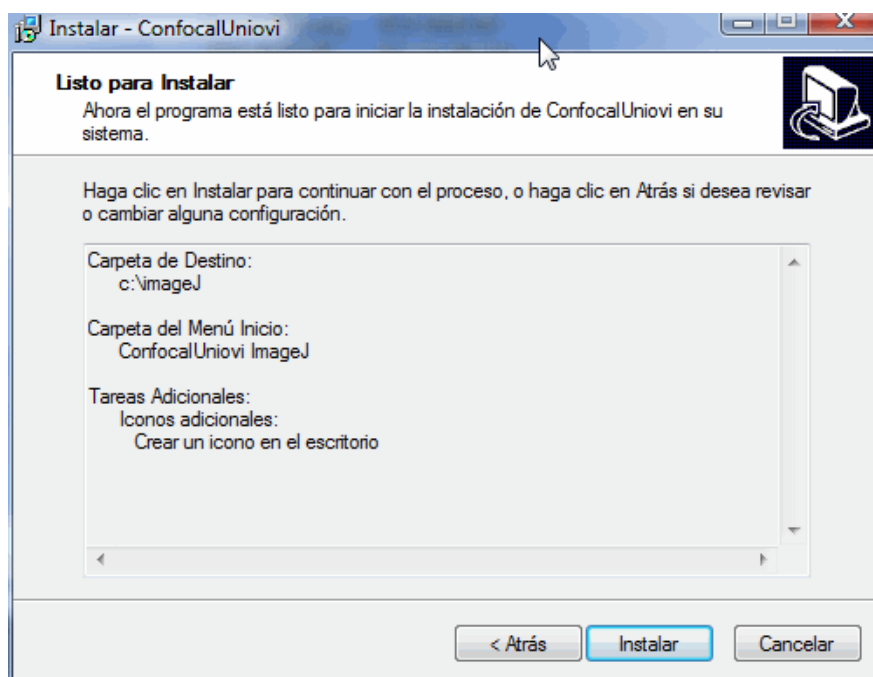
Introduciremos el nombre de la Carpeta del Menú de Inicio y volveremos a pulsar siguiente.



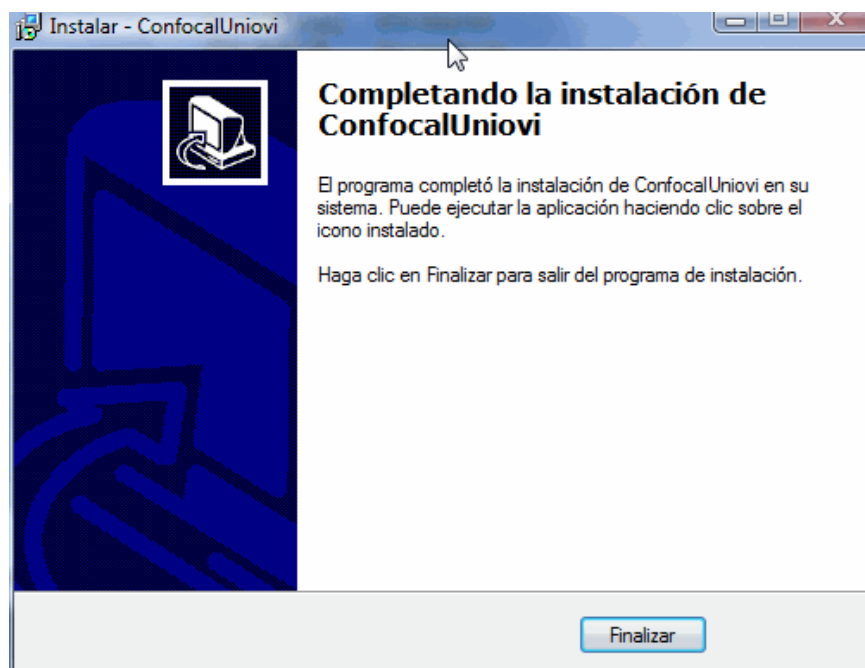
Si deseamos crear un icono de acceso directo en el escritorio marcaremos la opción correspondiente.



Finalmente se nos presentarán las opciones elegidas y si estamos de acuerdo pulsaremos el botón de “Instalar”.



Una vez finalizado el proceso de instalación nos aparece la siguiente ventana indicándonos que se completó con éxito la instalación.

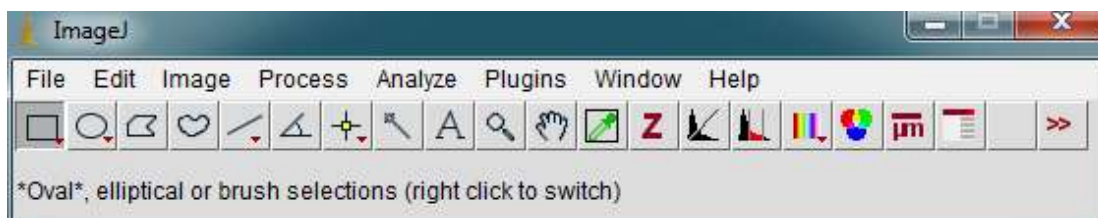


Si durante la instalación hemos seleccionado la opción correspondiente, al finalizar la instalación, en el escritorio, nos aparecerá un icono para acceder directamente al programa.

Funcionamiento.

Al arrancar el programa nos aparecen dos menús:

1- El general de ImageJ



2- El que contiene las funciones de ConfocalUniovi ImageJ.



A continuación se describen cada una de las funciones incluidas en el menú **Confocal Uniovi**.

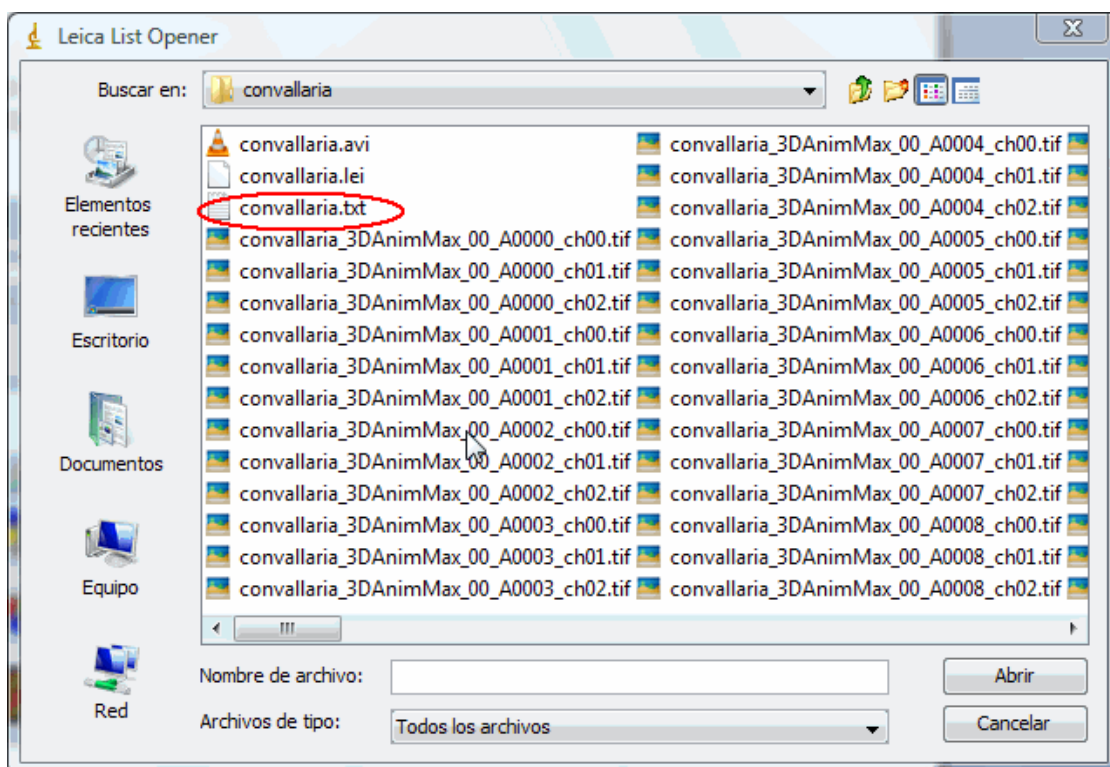
Para conocer el funcionamiento del menu principal de ImagJ ir a la documentación “on line” de la página Web: <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/>.



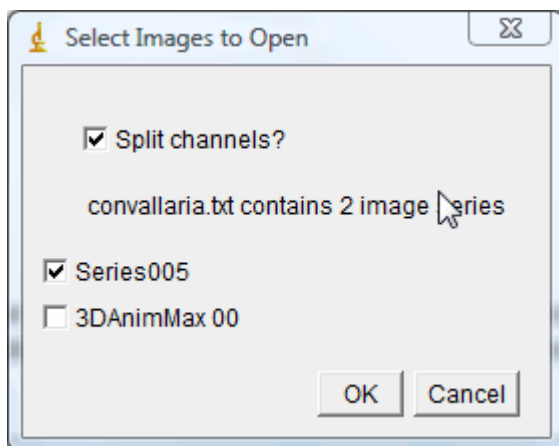
Leer imagen del Confocal Leica.

Permite abrir imágenes almacenadas en el formato del Microscopio Confocal Leica TCS SP2 AOBs. Este equipo almacena las imágenes por experimentos. Cada experimento se almacena en un subdirectorio que contiene: un fichero (lei) para la apertura del experimento en el microscopio confocal, un fichero de texto (txt) con la información de la configuración del microscopio (objetivos, ganancia, apertura del pinhole, tamaño de la imagen , etc) y un conjunto de imágenes que a su vez pueden estar formadas por series de imágenes de uno o varios canales. Cada una de las imágenes es un fichero .tif.

Al pulsar en el botón se nos abrirá el explorador de archivos, buscaremos el subdirectorio del experimento que nos interesa y seleccionaremos el fichero de texto (.txt)

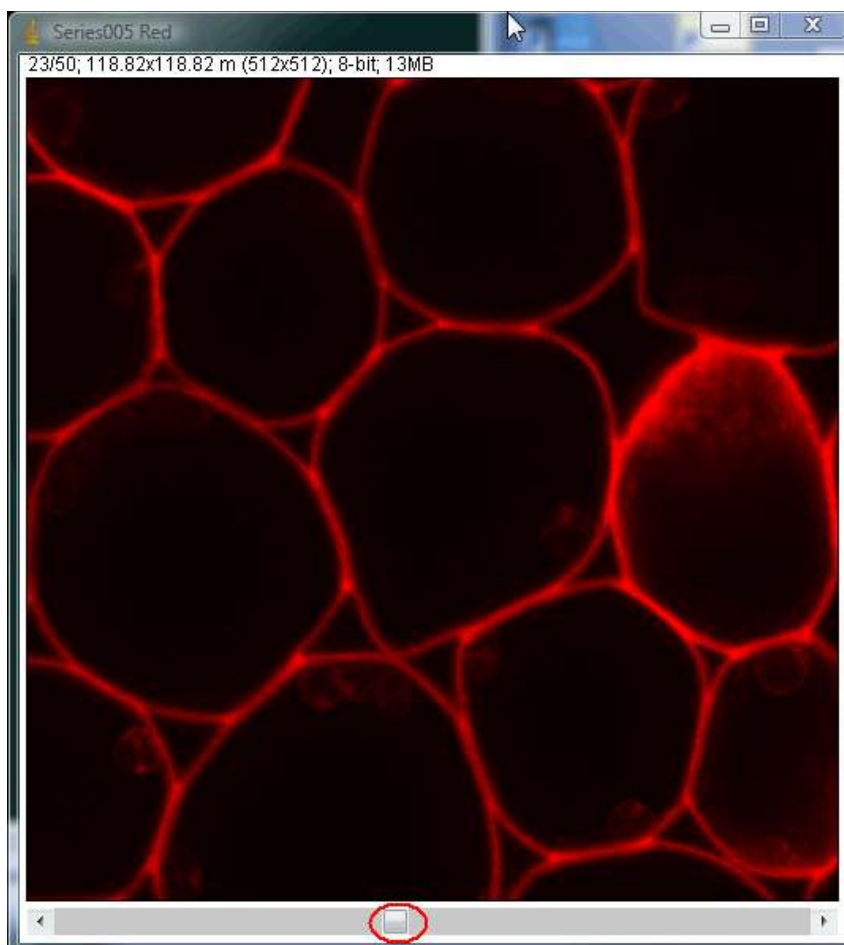


Nos aparecerá la siguiente ventana que nos permite escoger que imagen o conjunto de imágenes (en caso de que se trate de una serie) queremos abrir y, en caso de tener más de un canal, si queremos verlas como imágenes separadas o intercaladas en una serie.



Es aconsejable seleccionar la opción de “Split Channels” para ver los canales como imágenes separadas.

Si la imagen tiene más de una sección podemos desplazarnos por todo el conjunto moviendo la barra de la parte inferior.

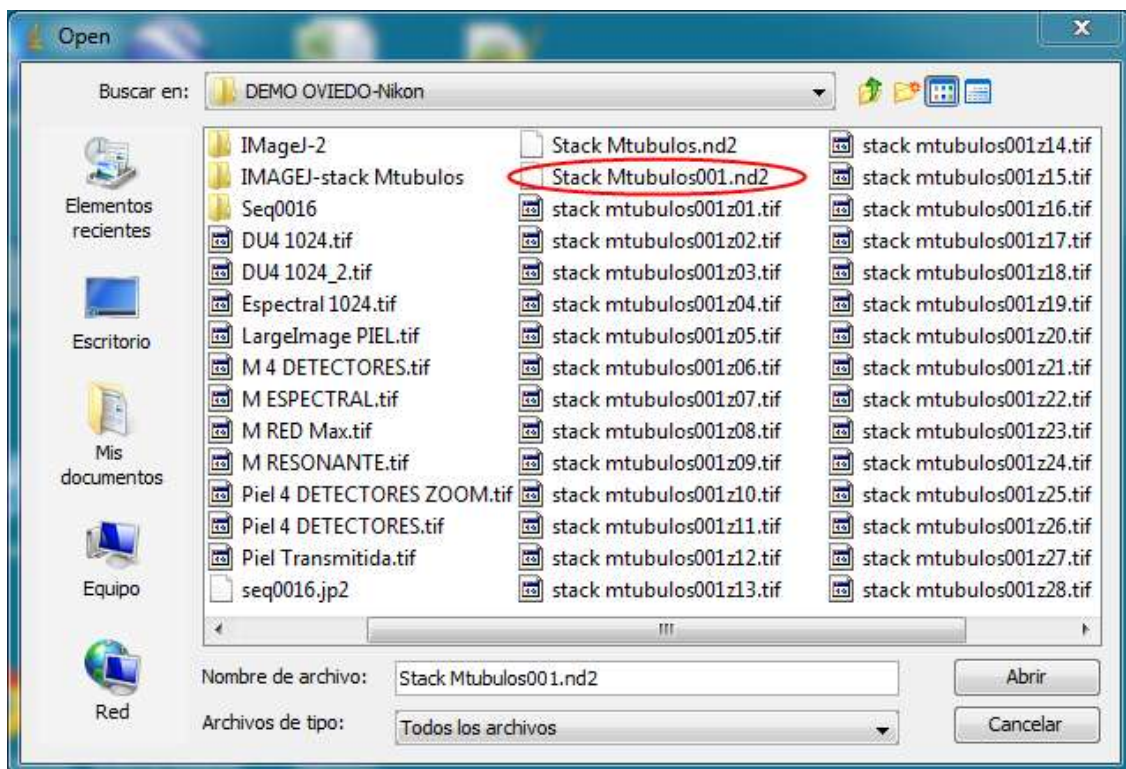




Leer imagen de cualquier microscopio (BIOFORMATO)

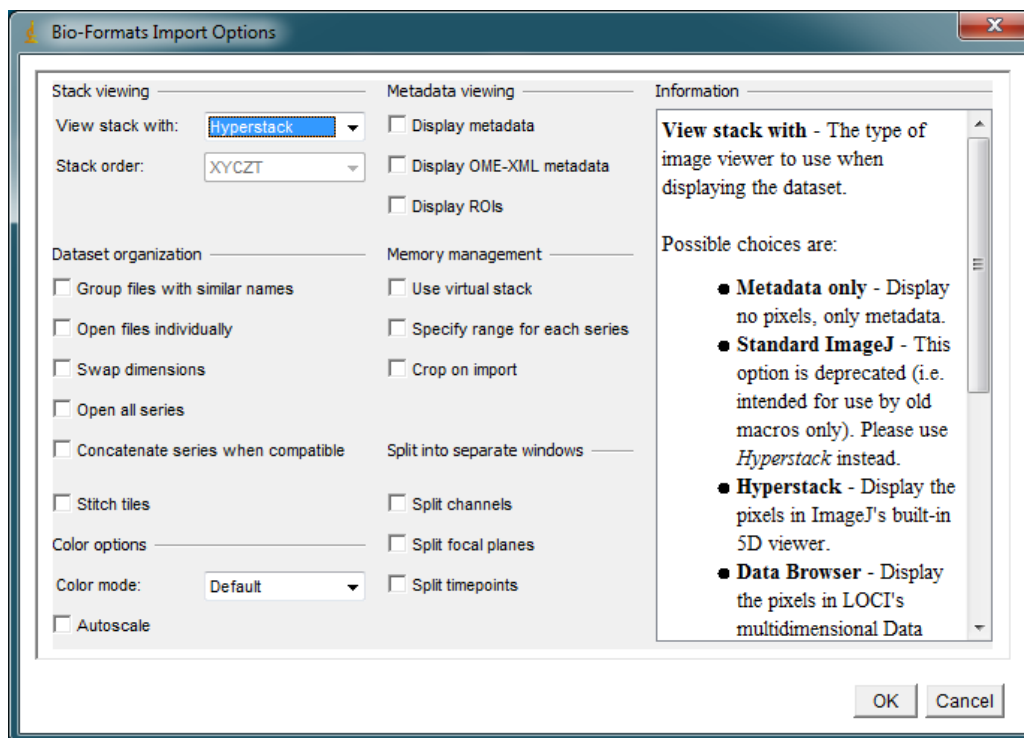
Permite leer múltiples formatos de imágenes microscópicas. Utiliza el pluging “Bio-Formats Importer” desarrollado por el *Laboratory for Optical and Computational Instrumentation* de la Universidad de Wisconsin-Madison (USA). (2). Con este pluging podemos abrir formatos de imagen de los Microscopios Confocal más habituales (Leica, Zeiss, Nikon, Olympus, Biorad, etc). Un listado de todos los formatos soportados puede consultarse en la siguiente dirección web: <http://loci.wisc.edu/bio-formats/formats>

Al pulsar el botón se nos abrirá el explorador de archivos, buscaremos el fichero que deseamos y pulsaremos abrir:

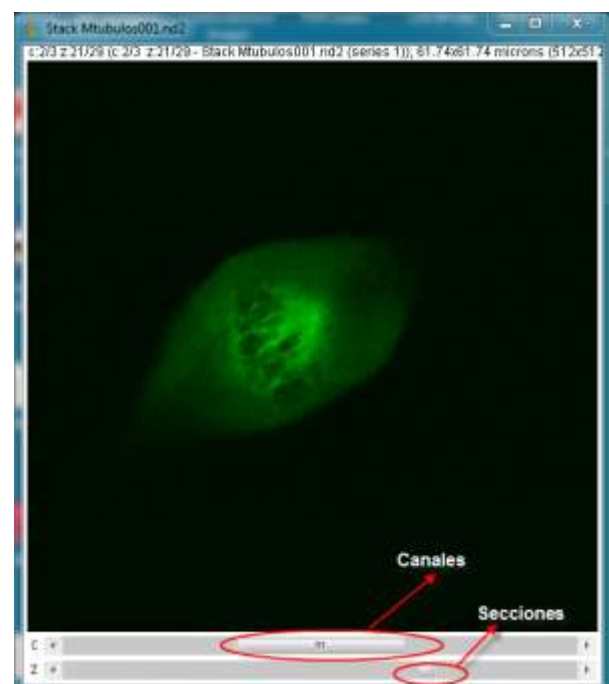
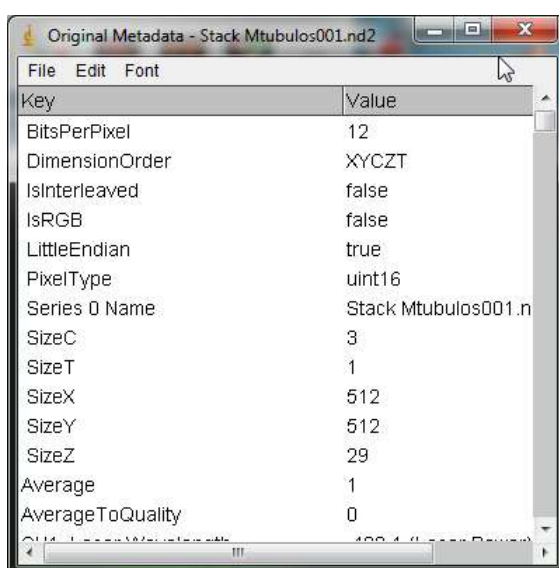


A continuación nos abre la ventana de importación de Bio-formatos en la que podremos elegir una serie de opciones a la hora de importar el fichero.

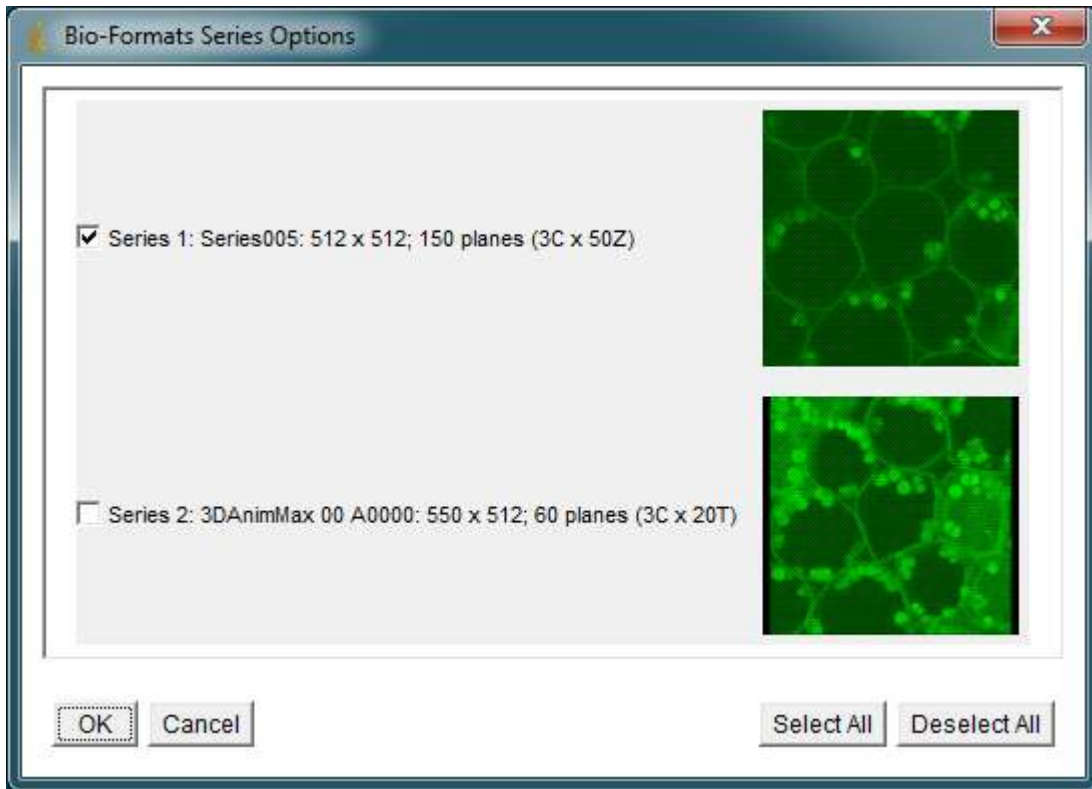
La explicación de las diferentes opciones aparece en la ventana “Information” cuando pasamos el cursor por el nombre de la opción.



El primer conjunto de opciones se refiere al tipo de datos del fichero que queremos visualizar (metadatos, imágenes...) y el modo en que los visualizaremos. Si seleccionamos "Hyperstack" y marcamos "Display metadata" se nos abrirá una ventana con los metadatos del fichero (bits por pixel, tamaño de imagen, nº de canales, objetivo utilizado para tomar la imagen, líneas de láser, etc) junto con una ventana que contiene un hyperstack. En el caso de una serie de varias imágenes de tres canales de fluorescencia la primera de las barras nos permite movernos en los distintos canales y la segunda entre las distintas secciones del canal seleccionado.



Cuando el Bioformato almacena varias imágenes de un mismo experimento o sesión (por ejemplo los formatos .lei y .lif de Leica) y seleccionamos "data browser" o "hyperstack" o "standard imagen" y desactivamos la opción de "open all series" en el apartado "dataset organization, el programa nos presenta un menú con las imágenes y series contenidas en ese experimento, permitiéndonos escoger la que deseamos abrir.



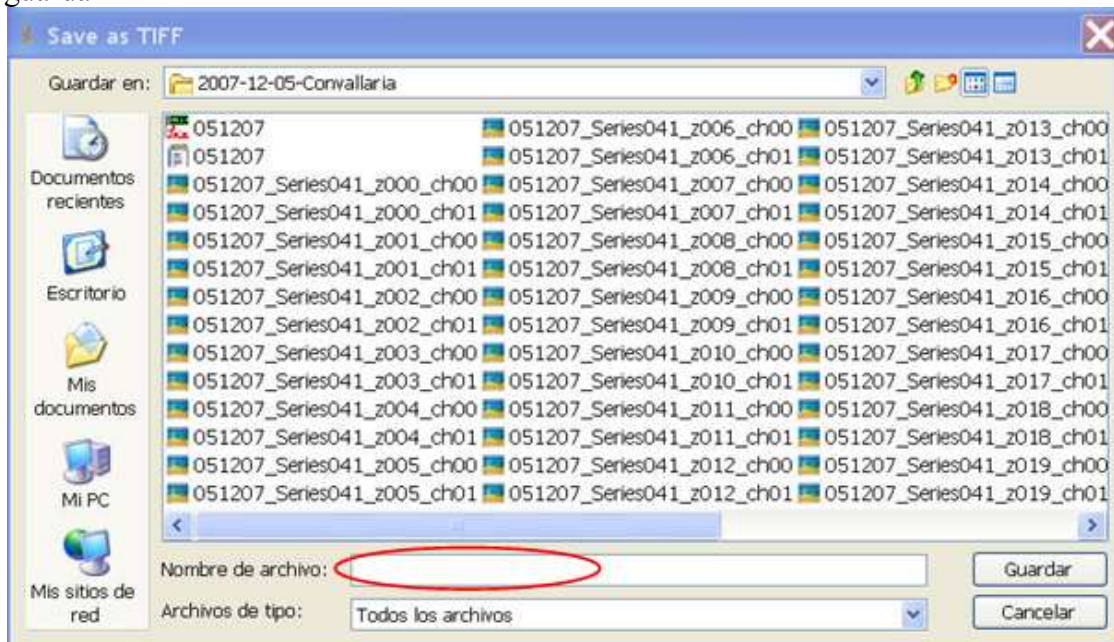
Si en un mismo experimento tenemos gran cantidad de imágenes y/o series, es muy posible que el programa tarde mucho tiempo en presentarnos el menú anterior o incluso se quede colgado. Por esta razón se ha mantenido la opción de "Leer imágenes del Confocal Leica" ya que en estos casos las abre más rápidamente y no se queda colgado.



Salvar TIFF

Permite salvar como tiff la imagen seleccionada.

Al pulsar el botón se nos abrirá el explorador de archivos, buscaremos la carpeta donde queremos guardar el fichero, escribiremos el nombre del fichero y pulsaremos el botón guardar



Si el fichero es una serie de imágenes se salvará toda la serie en un único fichero de imagen.




Cerrar imágenes

Al pulsar sobre este icono se cierran todas las imágenes abiertas



Duplicar imagen

Permite duplicar el fichero seleccionado, ya sea una serie o una única imagen

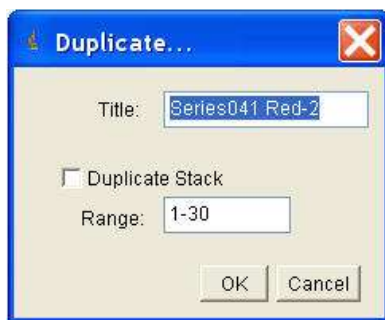
Si tenemos seleccionada la ventana de una imagen, al pulsar el botón  se abrirá la siguiente ventana:



Escribiremos un nombre para denominar la nueva imagen o dejaremos el que nos asigna el programa por defecto, pulsaremos OK y se creará una copia de la imagen.

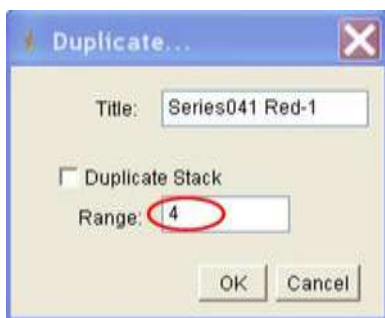


Si tenemos seleccionada la ventana de una serie, al pulsar el botón se abrirá la siguiente ventana:



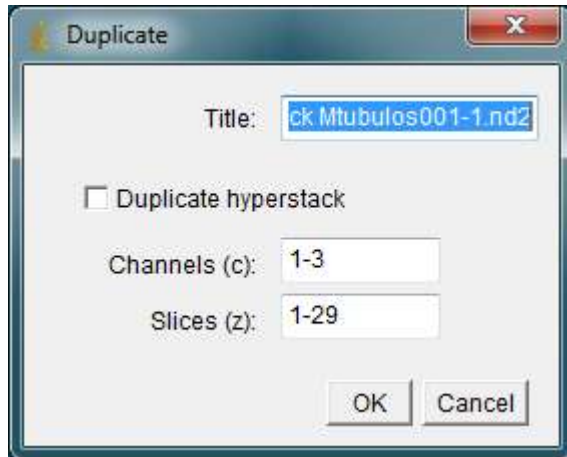
Si marcamos la casilla “duplicate stack” y pulsamos OK, se creará una copia de la serie.

Si queremos duplicar sólo una imagen de la serie, desactivaremos la casilla “duplicate stack” y escribiremos en la casilla “range” el número de posicionamiento de dicha imagen (en el ejemplo se selecciona la sección número 4 de las 30 secciones totales de la serie)



Si queremos duplicar un rango de imágenes de una serie, en la casilla “range”, escribiremos el rango que deseamos, por ejemplo 1-10 y nos duplicará las 10 primeras imágenes de la serie.

En el caso de que lo que queremos duplicar sea un “Hiperstack” nos aparecerá la siguiente ventana:



Al igual que en el caso anterior podemos seleccionar duplicar todo el hyperstack o elegir que canales y que secciones duplicar.

Esta función puede ser muy útil para eliminar secciones iniciales o finales con poca o nula información, o para separar canales en un hiperstack.



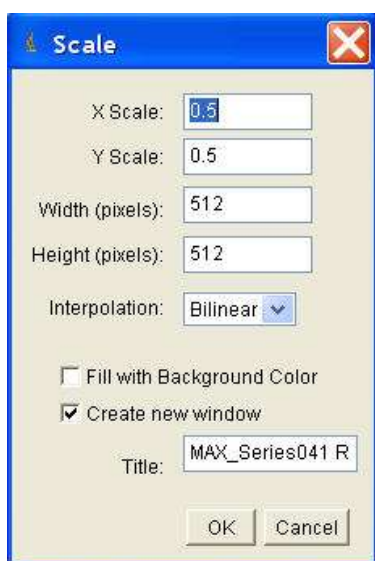
Escalar imagen

Permite modificar el número de píxeles de una imagen.

Al pulsar el icono se abre una ventana en la que podemos escribir el número de píxeles de la nueva imagen o bien el factor de aumento o reducción que le queremos aplicar. Cuando se trata de imágenes cuadradas los valores de Xscale o Yscale serán iguales, lo mismo sucede con los valores de ancho (width) y altura (height)

En caso de que estemos aumentando el número de píxeles de la imagen debemos indicar si queremos que los píxeles se creen como interpolación de los existentes con sus vecinos más próximos (bilinear o cúbica) o no queremos interpolación (none).

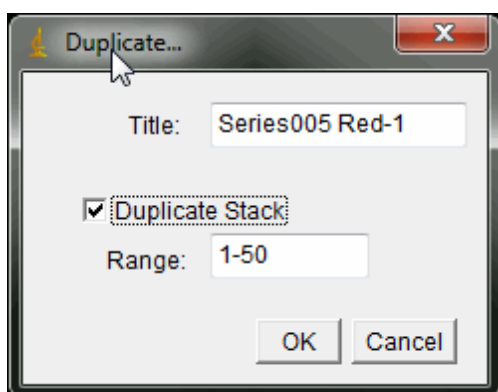
Si la casilla “Create new window” está activada, la nueva imagen aparecerá en una nueva ventana. Si se desactiva esta opción, la imagen original se elimina y sólo aparecerá la imagen escalada.



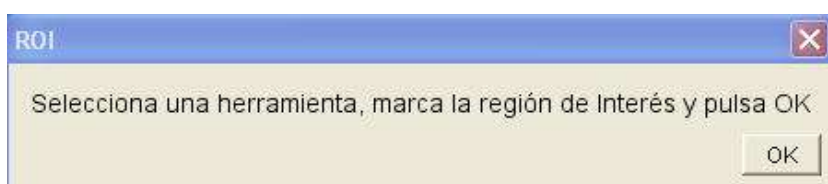
Seleccionar ROI

Permite seleccionar una región de interés (ROI; del inglés “region of interest”) en nuestra imagen o serie.


Al pulsar este icono aparece un mensaje en la pantalla para duplicar la imagen con el fin de que al extraer la región de interés no perdamos la imagen original:

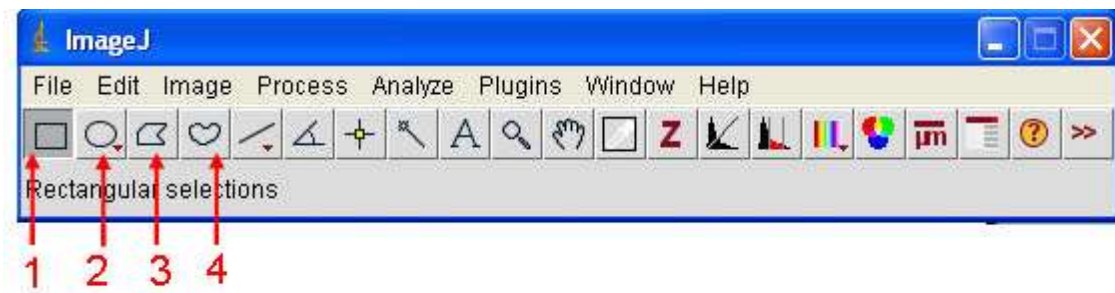


Una vez duplicada la imagen aparece el siguiente mensaje :





Desde el menú principal de ImageJ (ver icono ) deberemos seleccionar la herramienta necesaria para dibujar la ROI. Podemos seleccionar un rectángulo (1), un círculo (2), un polígono (3) o un dibujo a mano alzada (4).



Tras dibujar la ROI en nuestra imagen/serie, pulsaremos la casilla “OK” en el mensaje y la imagen se ajustará sólo a la ROI dibujada.

Si queremos dibujar varias ROIs en la imagen debemos mantener pulsada la tecla “mayúsculas – Shift”.



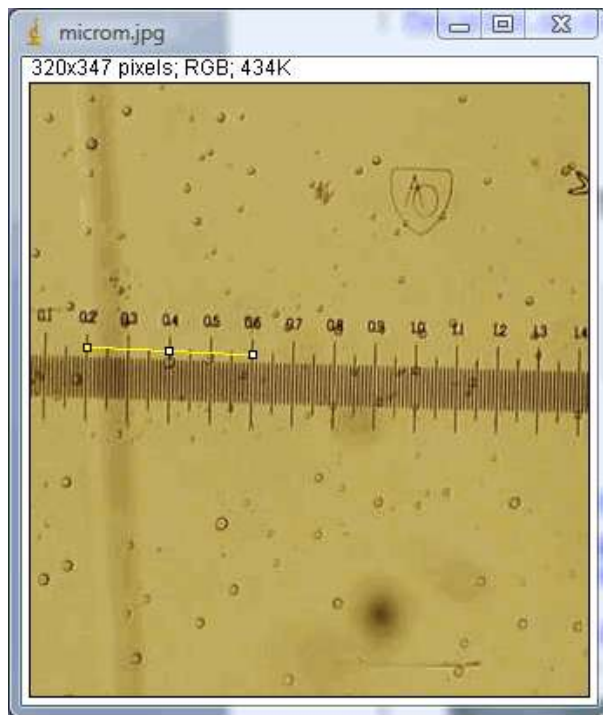
Calibrar imagen.

Con esta función podremos realizar una calibración de la imagen de manera que las medidas que hagamos se obtengan en unidades reales (micras, mm, cm, etc).

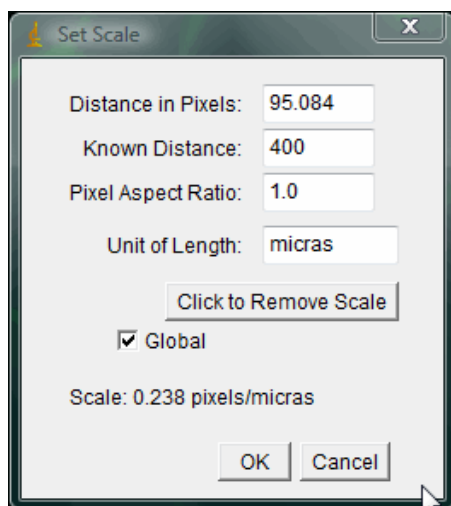
Para calibrar una imagen podemos proceder de dos maneras:

- **1 Si tenemos marcada en la imagen una distancia conocida.**

En este caso, con la herramienta línea  del menú de ImageJ marcaremos la distancia conocida.



A continuación pulsaremos en el icono “calibrar la imagen” y se nos abrirá el siguiente menú:

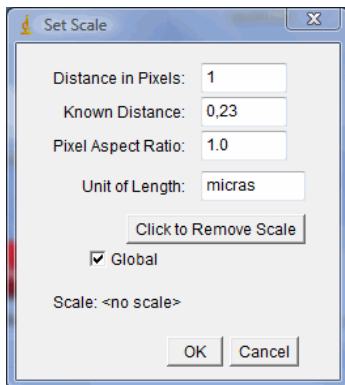


El primer valor “Distance in pixels” corresponde a la longitud en píxeles de la línea marcada y no debemos tocarlo. El siguiente valor “Know Distance” corresponde a la distancia en unidades reales de la línea marcada, en este caso 400 micras. El siguiente valor “pixel ratio” se refiere a la relación longitud/anchura del pixel. Siempre que trabajemos con píxeles cuadrados su valor será 1.0. En el campo “Unit of Length” teclearemos las unidades de medida (micras en este caso). Finalmente marcaremos el campo “global” si queremos que este factor de calibración se aplique

a todas las imágenes que abramos. En caso de que deseemos que se aplique sólo a esta imagen lo dejaremos sin marcar.

- **2 si conocemos el valor de calibración del píxel de la imagen.**

En el caso de conocer el valor de calibración del píxel de la imagen teclearemos su valor en el campo “Know Distance”. En el campo “Distance in Pixels” pondremos el valor 1 y el resto de los valores haremos como en el caso anterior.



Finalmente pulsaremos OK para aplicar esta calibración. En este momento aparece en la parte superior de la imagen la información de sus dimensiones reales, con las dimensiones en píxeles entre paréntesis.

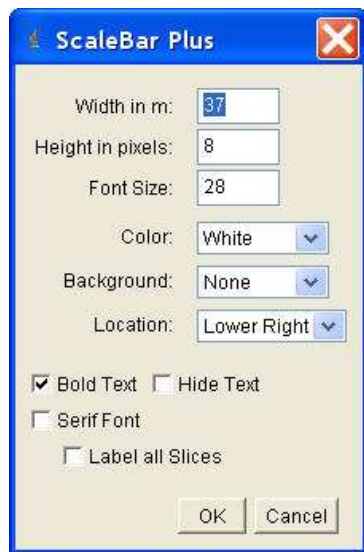
Si abrimos la imagen con la herramienta de leer Bioformato el programa lee del fichero de metadatos la calibración de la imagen y no es necesario realizar esta operación



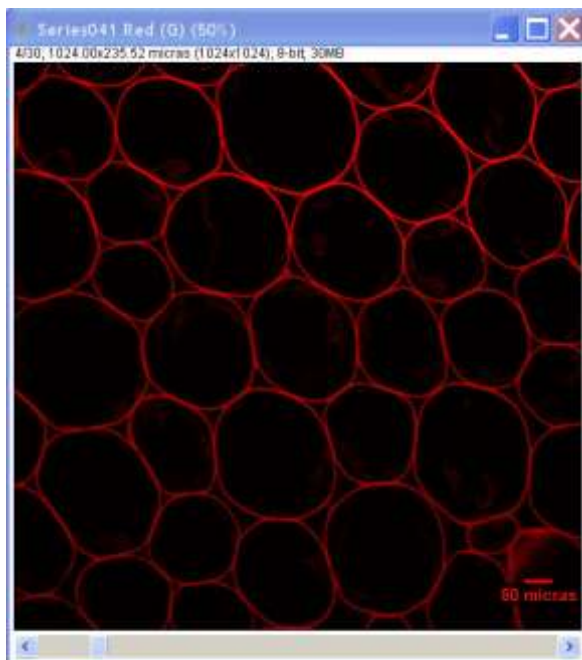
Pintar barra de escala

Con esta función podemos incluir una barra de escala en una imagen/serie/proyección. Primero debemos haber calibrado la imagen de trabajo siguiendo las instrucciones explicadas en el apartado anterior (Calibrar imagen) o bien haber abierto una imagen ya calibrada.

Al pulsar el icono se abrirá la siguiente ventana:



Escribiremos en “with in m” la longitud de barra de escala que deseamos añadir a nuestra imagen/serie/proyección y en “Hight in pixels” el grosor de la barra de escala. En “ Location” podemos escoger la posición donde colocar la barra de escala: “upper right”, “lower right”, “lower left”, “upper left” (La opción “at selection” no funciona).



El color de la escala será el de la paleta de colores LUT que tenga la imagen seleccionada, por tanto las opciones “Color” y “Background” de la escala no tienen utilidad y es preferible dejarlas como aparecen por defecto: “Color” = “White” y “Background” = “None”.

Si tenemos una serie abierta y activamos la opción “Label all Slices”, la barra de escala aparecerá en todas las imágenes de la serie.

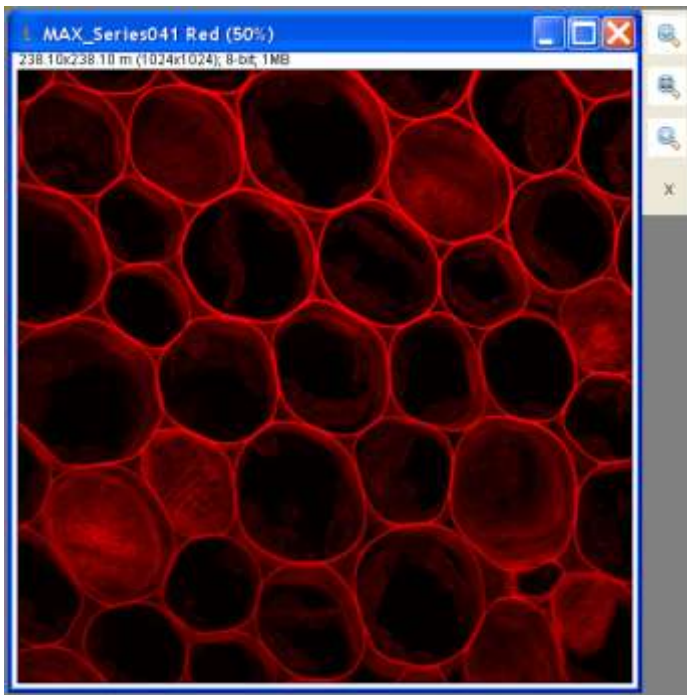
El texto que sale debajo de la barra de escala lo podemos poner en negrita marcando la casilla “Bold Text”, cambiar entre dos tipos de letra marcando la casilla “Serif Font” o cambiar el tamaño de letra escribiendo en “Font Size”. Si marcamos la casilla “Hide text” el texto desaparece y sólo veremos la barra de escala.



Zoom

Permite ampliar o reducir el tamaño de la imagen activada.

Al pulsar este icono se activa una barra con funciones de zoom que se adosa a la derecha de la imagen activada. Si pinchamos en otra imagen, la barra de zoom se desplaza a la nueva imagen seleccionada.



Dentro de la barra de zoom encontramos los siguientes botones:



“Zoom out”: Pulsando este botón se disminuye el zoom de la imagen hasta 3.1%.



“Reset zoom”: Elimina el zoom y deja la imagen a tamaño real (100%).



“Zoom in” : Aumenta el zoom hasta 3200%.



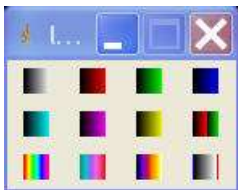
Cierra el menú de zoom.



Cargar LUT

Permite aplicar una paleta de colores a una imagen/serie/proyección.

Al pulsar este icono se abre la siguiente ventana:



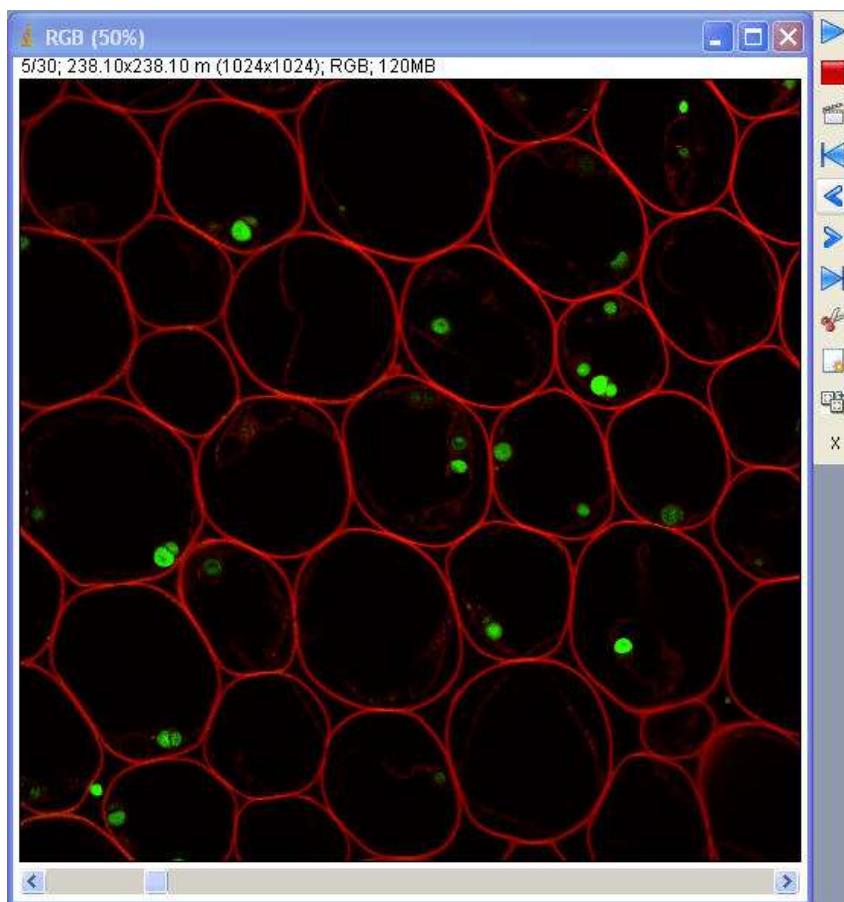
Seleccionando una de las paletas de colores, nuestra imagen se visualizará con esa gama de colores.



Animar series

Permite observar la serie en forma de animación

Al pulsar este icono se activa una barra que se adosa a la derecha de la imagen activada. Si pinchamos en otra imagen, la barra se desplaza a la nueva imagen seleccionada.



En la barra de “animar series” encontramos los siguientes botones:



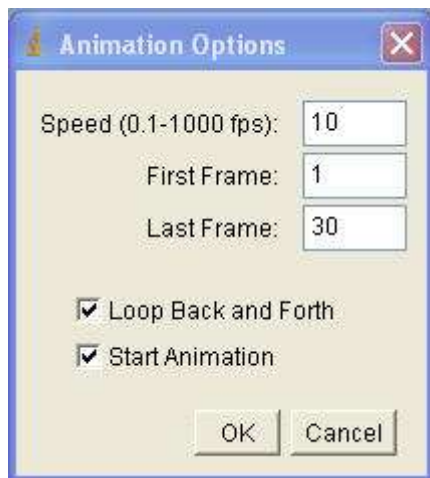
“Start animation”: pulsar para empezar la animación.



“Stop animation”: pulsar para parar la animación.



“Animation options”: abre una nueva ventana en la que podemos definir las opciones de la animación:



Podemos modificar la velocidad de la animación (“Speed”; imágenes por segundo) y también indicar cuál será la primera imagen (“First Frame”) y la última (“Last Frame”). Si activamos la opción “Loop Back and Forth” la animación irá del inicio al final y del final al inicio (efecto ping-pong). Si señalamos la opción “Start animation” la animación se activará inmediatamente al pulsar la casilla OK.



“Go to first slice”: abre la primera imagen de la animación.



“Previous slice”: abre la imagen anterior de la animación.



“Next slice”: abre la imagen siguiente de la animación.



“Last slice”: abre la última imagen de la animación.



“Delete slice”: elimina la imagen de la ventana .



“Add slide”: añade una imagen en negro.



“Duplicate slide”: duplica la imagen de la ventana.



Cierra el menú de “animar series”.



Separar bandas color

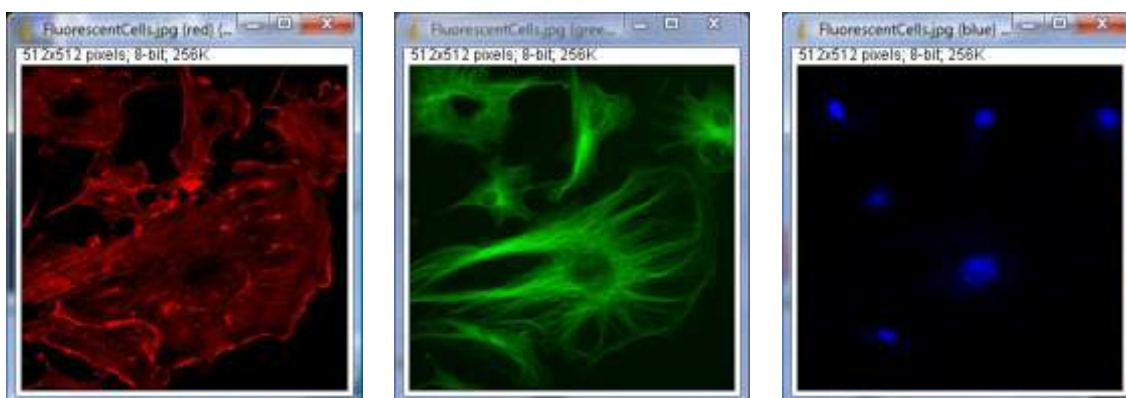
Permite separar una imagen RGB en tres imágenes independientes: rojo, verde y azul.

Cuando hemos abierto una imagen en formato Hyperstack con varios canales esta función nos permite separar cada uno de los canales en un stack individualizado.

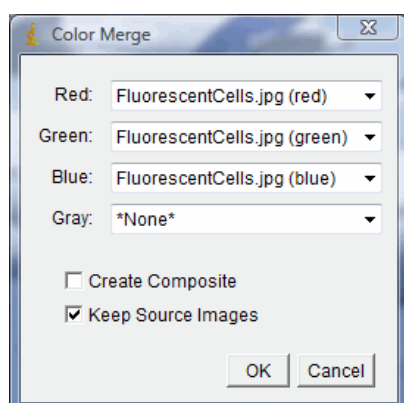


Mezclar bandas color

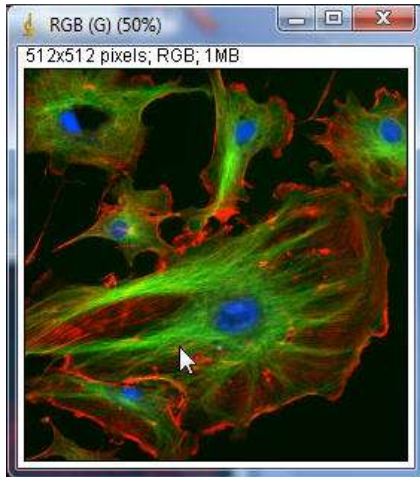
Genera una imagen mezcla a partir de imágenes de tres bandas de colores distintos. Esta función permite mezclar imágenes de dos o tres fluorocromos distintos en una única imagen. Por ejemplo si tenemos las tres imágenes siguientes:



Al pulsar en este icono se abre la ventana:



Se seleccionará para cada color el nombre de la imagen correspondiente. En nuestro ejemplo queremos mezclar una imagen roja, una verde y una azul y no tenemos imagen gris. La imagen resultante es la siguiente.



A esta imagen de tres bandas de fluorescencia se le podría añadir una imagen de transmisión o de contraste de fases, incluyendo su nombre en el campo correspondiente a imagen gris.

Seleccionando la opción “Keep Source Image” las imágenes originales de cada color no se eliminan de la pantalla.

Con esta función podemos mezclar imágenes individuales o series.

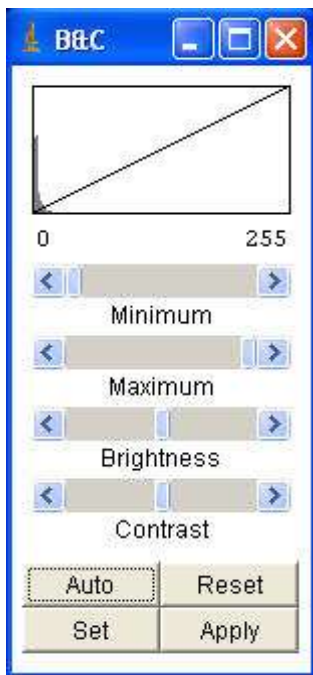
Si tenemos un hiperstack y queremos mezclar sus canales debemos utilizar primero la función separar bandas de color y a continuación la de mezclar bandas de color.



Ajustar Nivel Gris

Permite realizar un ajuste del brillo y contraste de la imagen o serie.

Al pulsar el icono se abre la siguiente ventana:



Moviendo las barras buscaremos el mejor ajuste de brillo y contraste para nuestra imagen.

Los botones inferiores en la ventana nos permiten:

Auto: ImageJ aplica automáticamente el ajuste de niveles de gris que el programa cree adecuado para la imagen.

Reset: elimina los cambios realizados.

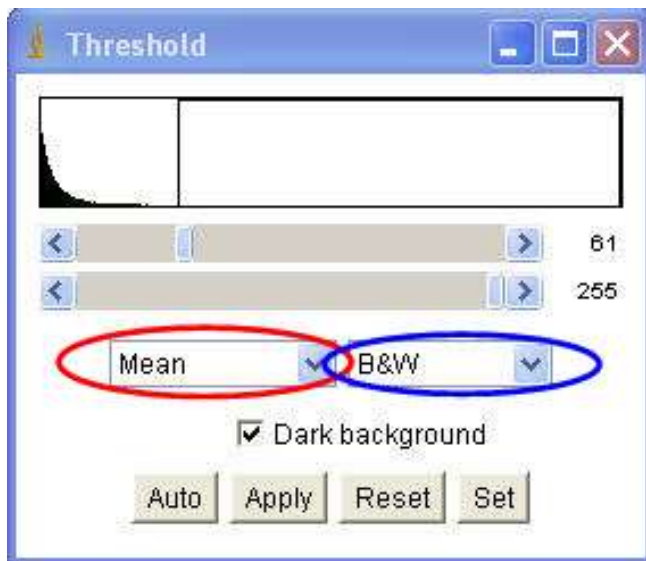
Set: permite escribir el valor mínimo y el valor máximo de intensidad para la imagen/serie.

Apply: aplica los cambios realizados sobre la imagen/serie.



Segmentación

Permite transformar nuestra imagen o serie en una imagen binaria.



Moviendo las barras buscaremos los mejores valores de segmentación para nuestra imagen.

El recuadro señalado en rojo nos permite escoger entre diferentes métodos de segmentación.

En el recuadro señalado en azul seleccionaremos la opción “B&W” y la opción “Dark background” debe estar activada.

Los botones inferiores en la ventana permiten:

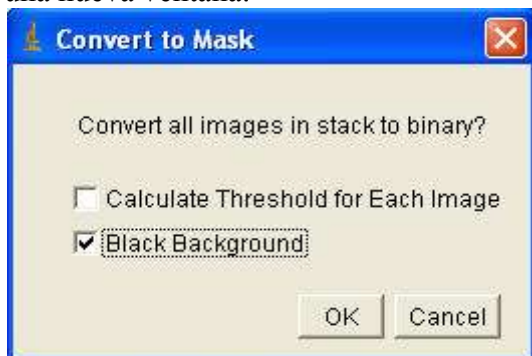
Auto: Se aplica automáticamente el método de segmentación elegido en la ventana anterior.

Reset: elimina los cambios realizados.

Set: permite escribir el valor mínimo y el valor máximo de segmentación para la imagen/ serie.

Apply: aplica los cambios realizados sobre la imagen/serie.

Una vez ajustados los valores de segmentación pulsaremos el botón “Apply” y se abrirá una nueva ventana:



Deberemos activar la opción “Dark background” y pulsar “OK”

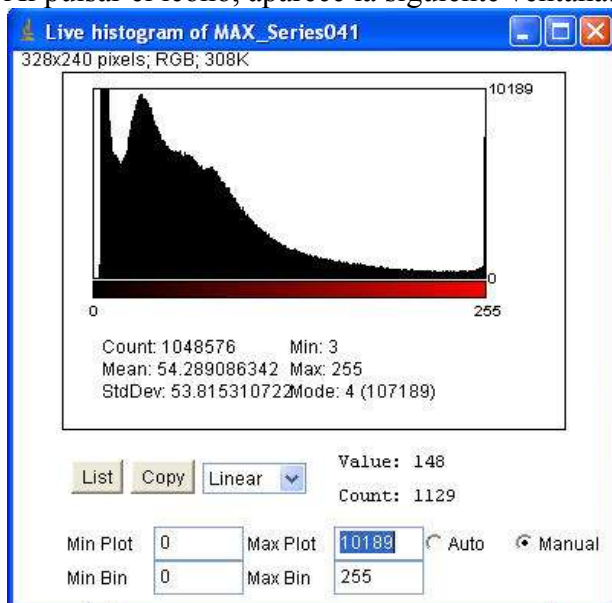
El resultado final de segmentación será una imagen binaria en la que el fondo tiene un valor de 0 y la señal de interés tiene un valor de 255.



Histograma interactivo

Permite conocer el histograma de intensidad de señal de nuestra imagen. Podemos aplicarlo a toda la imagen o a una región concreta de la imagen.

Al pulsar el icono, aparece la siguiente ventana:



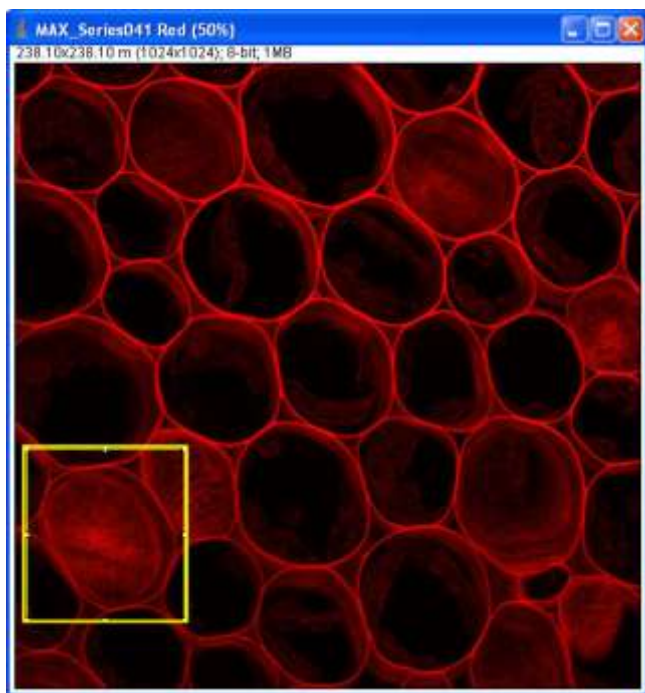
Si seleccionamos el modo manual, podemos cambiar las escalas del histograma. Los valores “Min Plot” y “Max Plot” son para el eje Y y los valores “Min Bin” y “Max Bin” son para el eje X.

Al pulsar el recuadro “List”, se abre una nueva ventana con los valores de niveles de intensidad del histograma. Este listado lo podemos guardar como una tabla de datos (fichero de Excel).

Al pulsar el recuadro “Copy”, copiamos los valores de intensidad del histograma y podemos pegarlos en un documento de texto (Word) o en un fichero de datos (Excel).

Si estamos trabajando con una serie, podemos ir viendo el histograma de cada imagen de la serie.

Si queremos conocer el histograma de una región concreta de la imagen/serie, dibujaremos con el ratón un rectángulo sobre la imagen y el histograma se aplicará a la región dibujada.



Proyección Z

Permite realizar una proyección en Z a partir de una serie de imágenes.

Al pulsar el icono de proyección Z aparece la siguiente ventana:



En la opción “Projection Type” podemos seleccionar entre varios tipos de proyecciones:

- “**Average Intensity**”: cada pixel de la proyección corresponde con el valor medio de cada columna

- **“Max Intensity”**: cada pixel de la proyección corresponde con el pixel de valor máximo de cada columna.
- **“Min Intensity”**: cada pixel de la proyección corresponde con el pixel de valor mínimo de cada columna.
- **“Sum Slides”**: cada pixel de la proyección corresponde con la suma de los valores de los píxeles de esa columna. La imagen resultante es una imagen de 32 bits por pixel para que los valores de la imagen resultante puedan ser superiores a 255
- **“Standard Deviation”**: cada pixel de la proyección corresponde a la desviación standard de los píxeles de esa columna. La imagen resultante es una imagen de 32 bits por pixel para que puedan tener píxeles con valores decimales
- **“Median”**: cada pixel de la proyección corresponde al valor de la mediana de los píxeles de esa columna.

El tipo de proyección más utilizado habitualmente es el “Max intensity”.

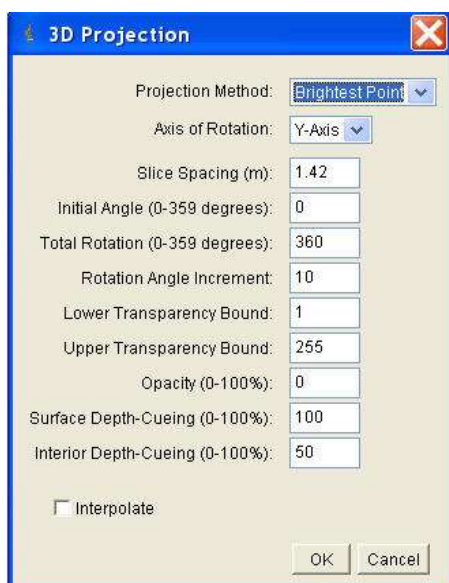
Si deseamos hacer una proyección de un número determinado de secciones dentro de la serie, podemos escribir el número de la imagen de inicio y de final de la proyección en los apartados “Start slide” y “Stop slide”, respectivamente.



Proyección 3D

Permite realizar, en forma de animación, una proyección en Z desde distintos ángulos para tener una vision completa de la estructura tridimensional de la muestra. Para utilizar está función debemos trabajar con una serie de imágenes.

Al pulsar el icono de proyección 3D aparece la siguiente ventana:



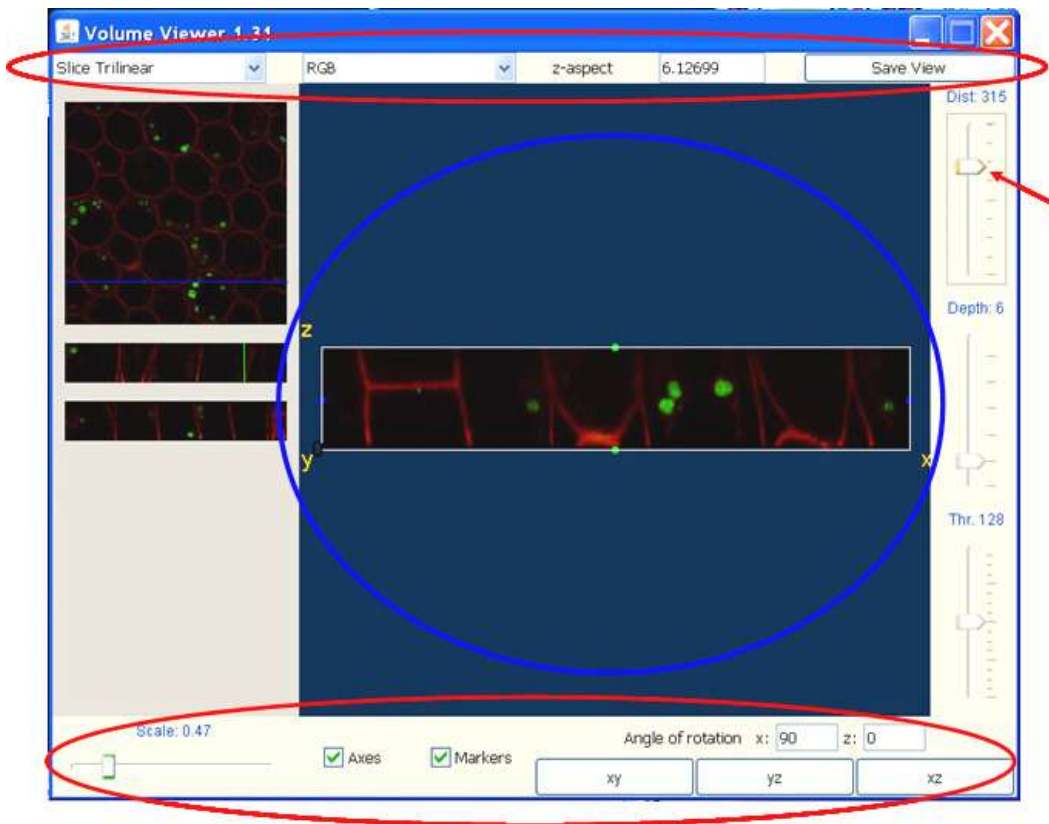
- “Projection method”: Nos permite elegir entre 3 métodos: “Nearest point”, “Brightest Point” y “Mean value”. El más utilizado es el “Brightest Point”
- “Axis of rotation”: Podemos elegir entre rotar la reconstrucción tridimensional en el eje X, el Y o el Z.
- Slide spacing: es la distancia entre secciones ópticas. Si hemos abierto la imagen como un hyperstack con la función de Abrir Bioformato el programa incluirá de forma automática este valor. Si no lo hubiese hecho podemos obtenerlo buscándolo en el fichero de metadatos.
- “Initial angle”: indicaremos el ángulo donde queremos iniciar la animación.
- “Total rotation”: indicaremos los grados totales de la animación.
- “Rotation angle increment”: indicaremos el incremento en ángulos entre una posición y la siguiente.
- Los parámetros de “Lower transparency bound”, “Upper transparency bound” y “Opacity” están relacionados con la intensidad de los pixels en la reconstrucción 3D. Se recomienda dejar los que aparecen por defecto.
- “Surface Depth-Cueing” y “Interior Depth-Cueing”: Dejar el dato que aparece por defecto; sólo se aplica en series con un gran número de secciones ópticas
- “Interpolate”. Si marcamos esta casilla el programa genera la información entre planos obteniendo una reconstrucción 3D de mayor calidad. Si la dejamos sin marcar los píxeles correspondientes a zonas entre planos aparecen en negro. Es aconsejable utilizar esta opción aunque el proceso de reconstrucción sea más lento.



Secciones ortogonales

Permite realizar secciones ortogonales de un volumen de una serie de forma interactiva, desplazándose en cualquier eje sobre la serie y pudiendo capturar las imágenes obtenidas. Para utilizar esta función debemos trabajar con una serie de imágenes.

Al pulsar el icono aparece la ventana del visor interactivo de volumen de ImageJ.



En el centro aparece la imagen del visor interactivo (círculo azul).

En la zona inferior de la ventana tenemos las opciones para:

- 1- cambiar la escala de la imagen que aparece en el visor interactivo (“Scale”)
- 2- activar o desactivar los ejes (axes) y las marcas (“Markers”) del visor interactivo
- 3- cambiar el ángulo de visión del volumen pulsando en las casilla “xy”, “yz”, “xz”
- 4- definir en “angle of rotation” el ángulo x y z con el que nosotros queremos estudiar nuestro volumen.

Para desplazarnos interactivamente sobre el volumen de nuestra serie, pulsaremos la barra indicada con una flecha roja en la ventana del visor interactivo de volumen de ImageJ y desplazaremos el ratón. La imagen del visor interactivo irá cambiando según nos desplazemos en los ejes seleccionados. En el margen izquierdo de la ventana se representa la información de los tres ejes (xy, xz y yz) y se señala en cada eje con una línea la posición a la que corresponde la imagen que aparece en el visor interactivo.

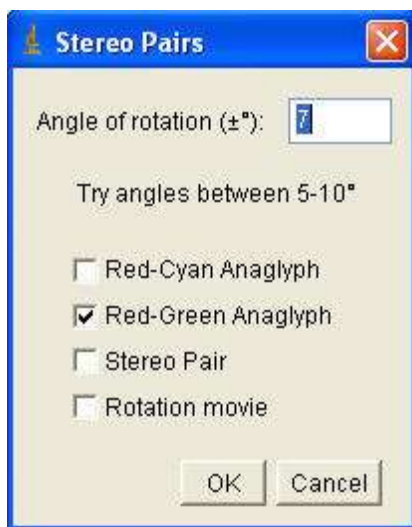
Si queremos salvar la imagen que aparece en el visor interactivo, pulsaremos la casilla “save view” en la zona superior derecha de la ventana.




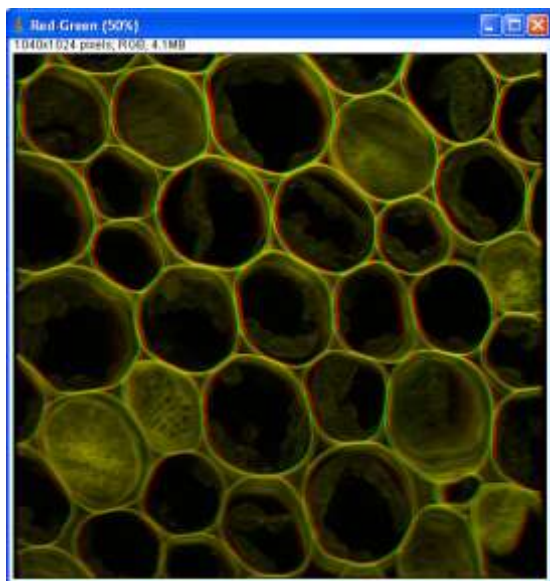
Par estereoscópico

Permite crear un par estereoscópico a partir de una serie de imágenes.

Al pulsar el icono se abre una ventana en la que señalaremos la opción “Red-Green Anaglyph”.



El programa comienza a generar las dos proyecciones y finalmente muestra la imagen “Red-Green” que deberemos ver utilizando las gafas estereoscópicas (.

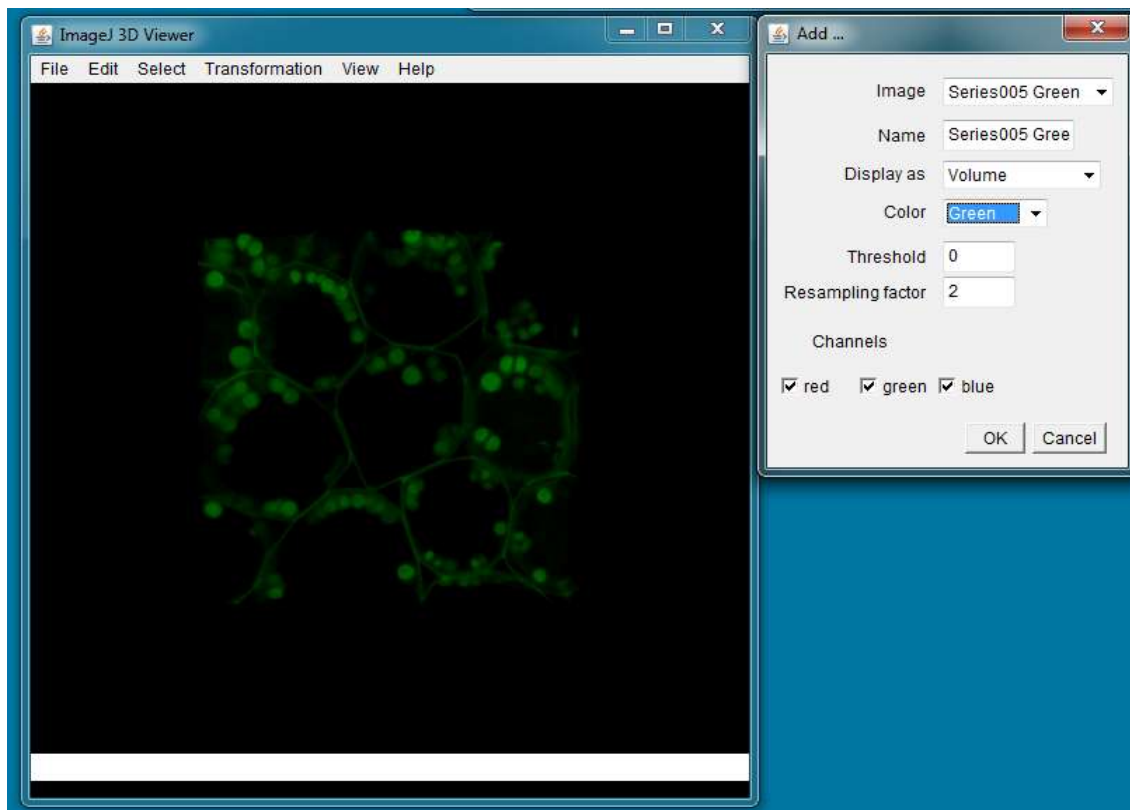


Visor de imágenes 3D

Realiza reconstrucciones en tres dimensiones de una serie de imágenes sucesivas de un volumen de muestra y las visualiza en diferentes formatos.

Al pulsar en el icono se nos abre la ventana de visualización. Previamente tenemos que tener abiertas la serie de imágenes que queremos visualizar.

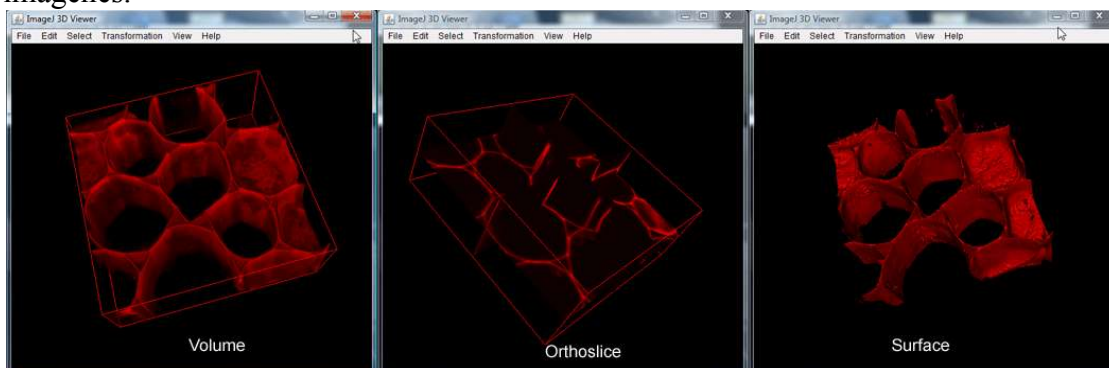
Para cargar una serie de imágenes en la ventana de visualización iremos a: “File / Add content”. Se abrirá el siguiente menú:







Los parámetros que debemos seleccionar son:

- **Image.** Seleccionaremos la serie de imágenes que queremos visualizar, podemos seleccionar cualquier serie de imágenes que tengamos abierta.
- **Name.** El nombre de este contenido en el visor. Puede haber más de un contenido visualizándose simultáneamente.
- **Display as.** Método de visualización del volumen. Tenemos tres opciones:
 - **Volume.** La imagen se visualiza como un volumen con la información de todos los píxeles en el espacio tridimensional.
 - **OrthoSlice.** Se visualizan tres secciones ortogonales (x,y,z).
 - **Surface.** Se visualiza un volumen renderizado.
- **Color.** Permite seleccionar el color en el que queremos visualizar el objeto.
- **Threshold.** En caso de que elijamos la opción “surface” indica la porción de volumen que se visualiza en función de su intensidad. Las zonas del volumen que tienen una intensidad por debajo del valor de Threshold no se visualizan.
- **Resampling factor.** Es el factor por el que la serie de imágenes es remuestreada para realizar la renderización. Un factor de 1 utilizará todas las secciones para renderizar , un factor de 3 utilizará 1 de cada 3 secciones en la renderización. Cuanto menor es este factor más exacta es la renderización y más tarda en realizarla.
- **Channels.** Si estamos visualizando una imagen en color marcaremos los canales que queremos visualizar. En caso de imágenes monocromas podemos dejar marcados los tres.

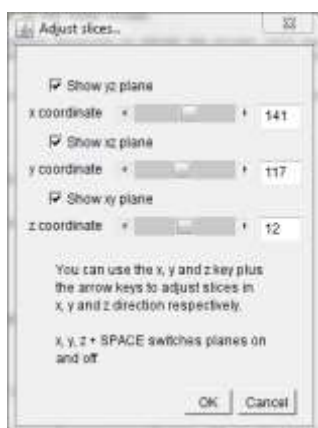
A continuación pueden verse tres tipos de visualización 3D de la misma serie de imágenes.



Para variar la vista del objeto utilizaremos las siguientes combinaciones de herramientas de ImageJ y botones del ratón:

Operación	Herramienta de ImageJ	Procedimiento
Rotar		Mover el ratón pulsando el botón izd
Desplazar		Pulsar la tecla “shift” y mover el ratón pulsando el botón izd.
Zoom		Mover la rueda del ratón
Zoom		Mover el ratón pulsando el botón izd

Podemos cambiar las secciones visualizadas en modo Orthoslice pulsando en Edit/ Ajust Slices,. Nos aparece el siguiente menú con el que podemos variar cada una de las secciones en los planos yz, xz y xy.



Podemos usar también las teclas rápidas, manteniendo pulsadas las teclas x, y o z, y moviendo la rueda del ratón o las flechas del teclado.

Cuando tenemos más de un contenido visualizándose simultáneamente podemos rotar simultáneamente todos los contenidos o uno de ellos. Para rotar un contenido

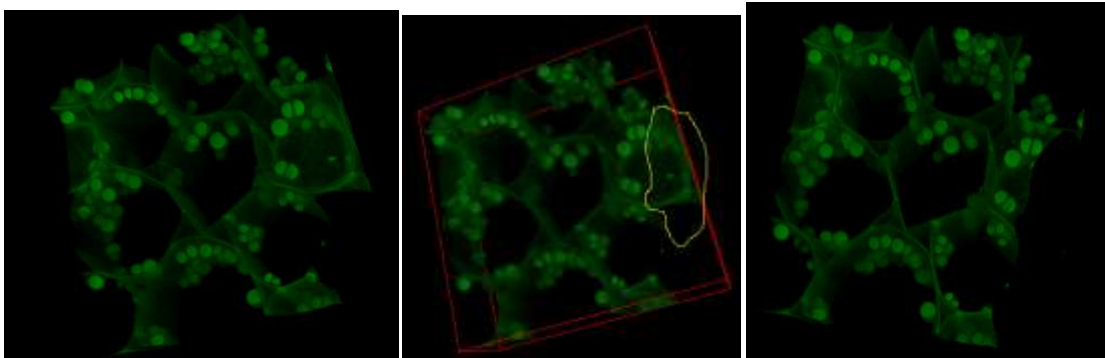
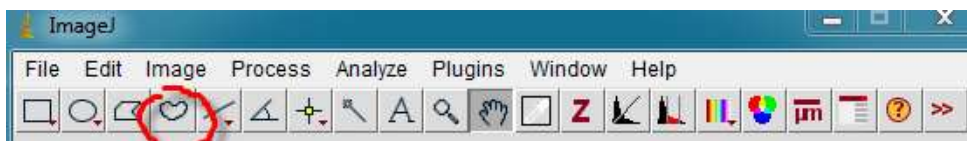
pulsaremos sobre él para seleccionarlo y nos aparecerá un recuadro marcando el contenido. Si realizamos la operación de rotar únicamente girará ese contenido. Para rotar todos los contenidos hay que pulsar con el ratón en una zona en que no haya nada, para deseleccionar todos los contenidos. Una vez deseleccionados si realizamos la rotación nos rotará todo.

Si tenemos más de un contenido visualizándose, para que se muevan conjuntamente deberemos seleccionar los dos o más contenidos desde menu/select y después activar la opción "lock" desde menu/Transformation/Lock

Es posible cambiar el color o el modo de visualización de un contenido, para ello primero debemos seleccionar dicho contenido (nos parecerá el recuadro rojo) y a continuación pulsando en "edit" seleccionaremos "display as" para cambiar el modo de visualización o "attributes" para cambiar los atributos de la imagen (color, transparencia, threshold, etc).

La opción "fill selection" del menú "edit" ofrece la posibilidad de eliminar zonas de nuestro volumen. Esta opción sólo funciona en el modo de visualización de volumen. Para trabajar con esta opción primero seleccionaremos el volumen del que queremos eliminar una zona, a continuación, en el menú de ImageJ seleccionaremos la herramienta de dibujo a mano alzada, a continuación marcaremos con el ratón la zona a eliminar y seleccionaremos: "edit"/"fill selection". La zona de volumen seleccionada se nos borrará de la imagen.

Con esta opción podemos cortar un volumen para ver lo que hay detrás.



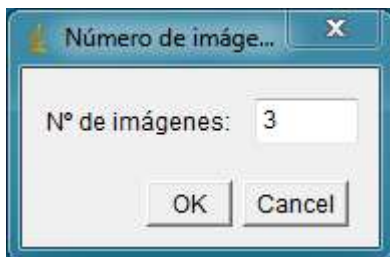
Esta función utiliza el plugin 3D Viewer desarrollado por Benjamin Schmid, Albert Cardona, Mark Longair, Johannes Schindelin (2)



Pegar imágenes

Esta función permite pegar imágenes consecutivas para formar una única imagen (mosaico de imágenes). Las imágenes deben de tener una parte común para que el programa realice la unión de forma correcta.

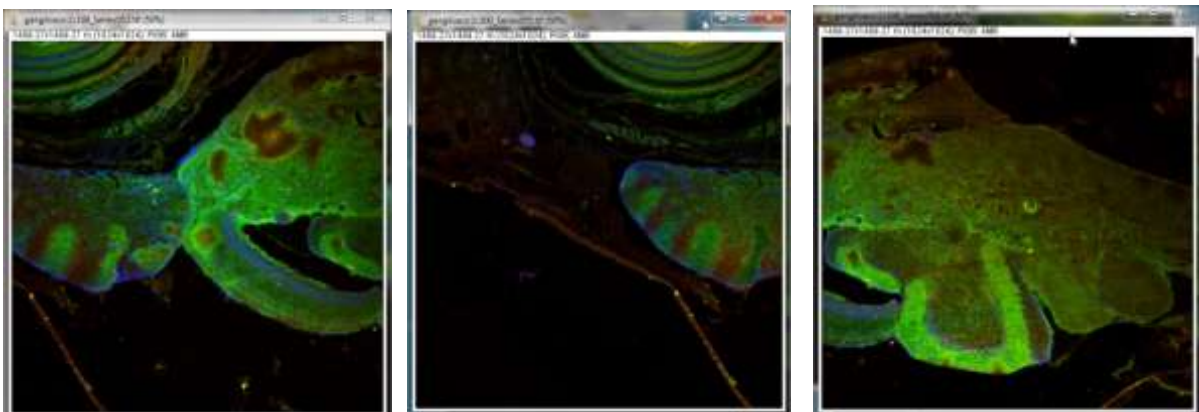
Al pulsar en el icono nos aparece un mensaje pidiéndonos el número de imágenes a pegar.



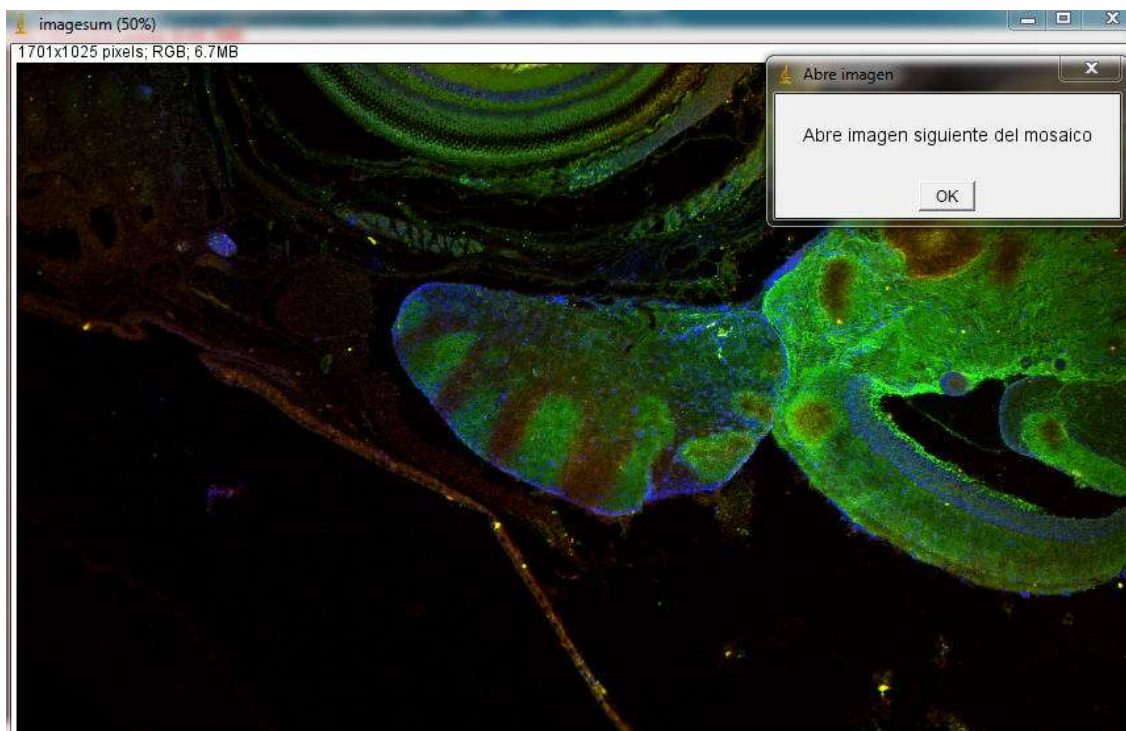
A continuación nos pedirá que abramos la primera imagen del mosaico



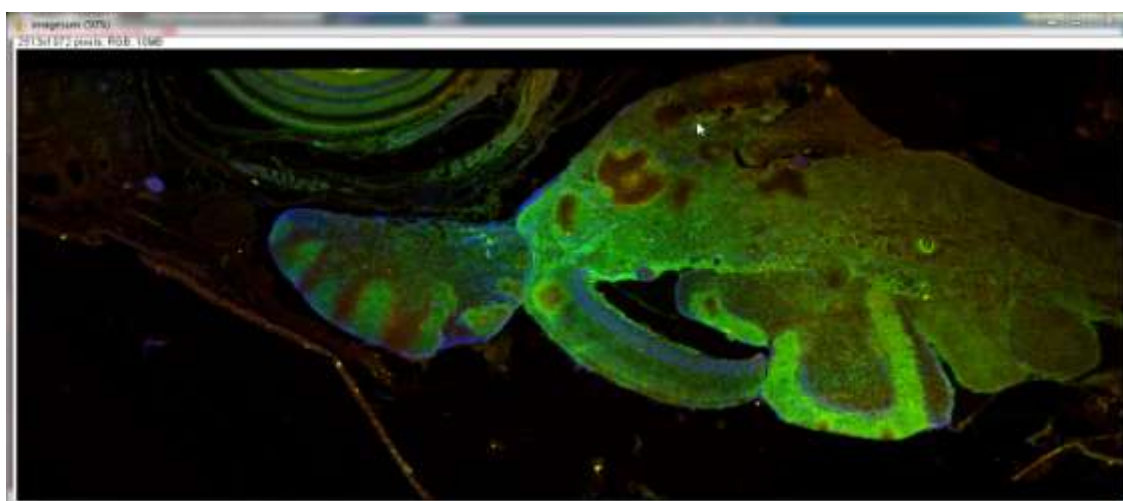
Pulsaremos OK y seleccionaremos la primera imagen, a continuación nos pedirá abrir la imagen siguiente que compone el mosaico. Esta imagen debe de tener una parte en común con la primera.



Una vez abierta la segunda imagen el programa iniciará la función de pegado. Debemos esperar hasta que nos aparezca la imagen resultante (dependiendo del tamaño de las imágenes y de la potencia del ordenador este proceso puede llevar su tiempo).



Una vez mostrada la imagen resultante, si tenemos más imágenes para pegar, el programa pedirá que abramos la siguiente y la pegará al mosaico de las dos anteriores.



Este proceso se repetirá hasta que haya pegado todas las imágenes.

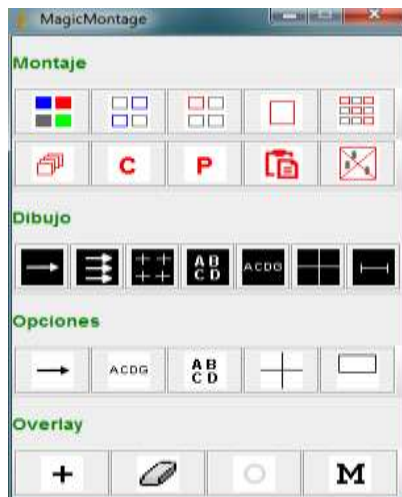
Cuando se trata de realizar mosaicos compuestos de varias filas de imágenes es aconsejable realizar los mosaicos de cada fila individualmente y posteriormente juntarlos.

Esta función utiliza el pluging “Stitching” desarrollado por S. Preibisch, S. Saalfeld, P. Tomancak (3).




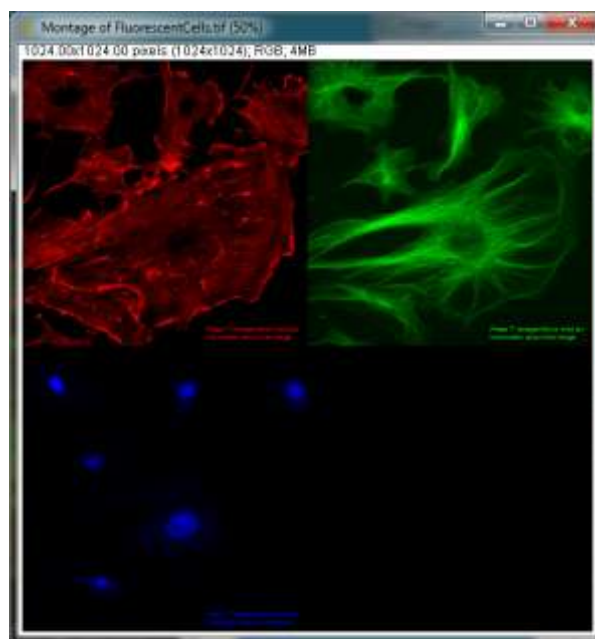
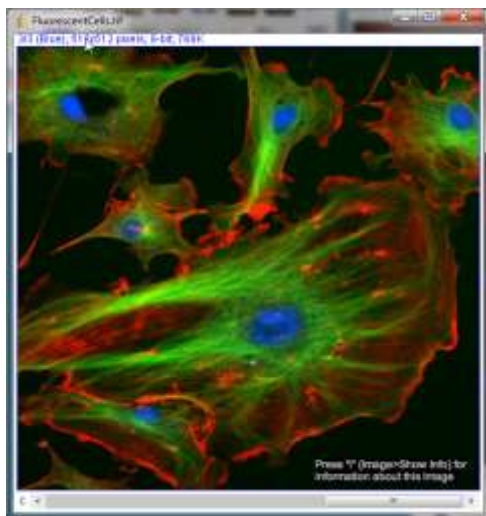
Realizar Montaje


Utiliza el pluging “Magic Montage” para crear montajes de series de imágenes o imágenes RGB. Pulsando en el botón se abre el siguiente menú:



Herramientas de "Montaje"

 **Crear Montaje.** Crea un montaje de la imagen seleccionada, separando las distintas bandas o stacks en paneles. Por ejemplo si seleccionamos la siguiente imagen de la izquierda (fluorescentCells.tif):



Al pulsar el icono  obtendremos la imagen de la derecha con la imagen separada en tres paneles (uno para cada canal).



Intercambiar/ Mover. Pulsando en este botón podemos intercambiar los paneles entre sí o moverlos a una nueva posición. Para ello pulsamos con el ratón encima del panel que queremos mover, nos aparece una especie de muelle con el que seleccionamos la nueva posición, soltamos el ratón y nos cambiará las posiciones de los paneles. Si la posición de destino no está ocupada por ningún panel, nos moverá el panel seleccionado, dejando vacía la posición que ocupaba. Si queremos ampliar el tamaño del montaje con nuevas posiciones llevaremos el extremo del muelle hacia uno de los bordes, siempre ampliando el tamaño del montaje hacia la derecha.



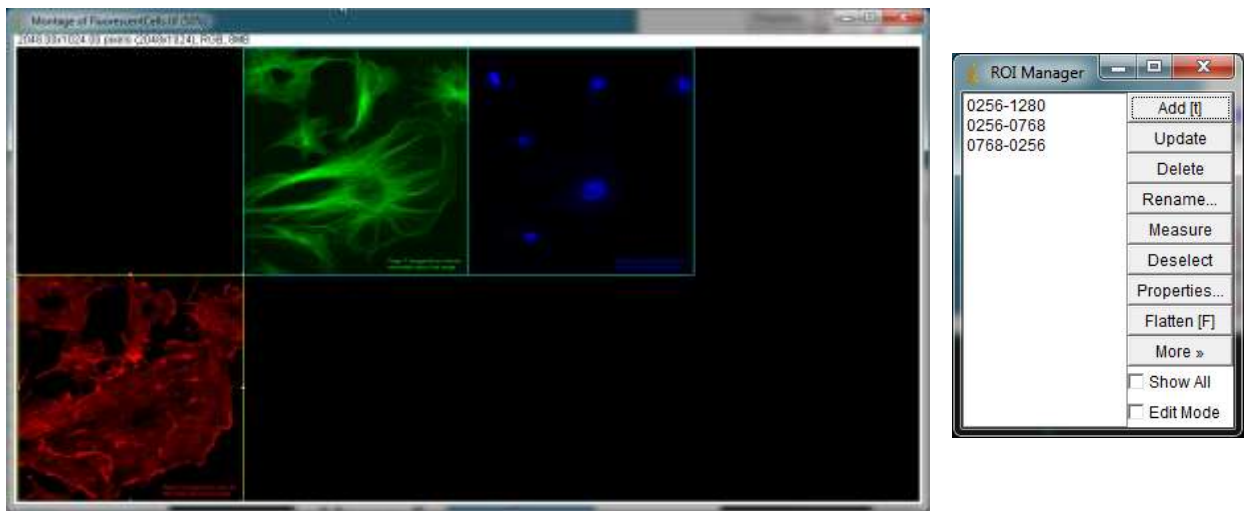
Seleccionar panel. Permite seleccionar uno de los paneles del montaje.



Extraer Seleccionado. Extrae el panel seleccionado a una nueva imagen.



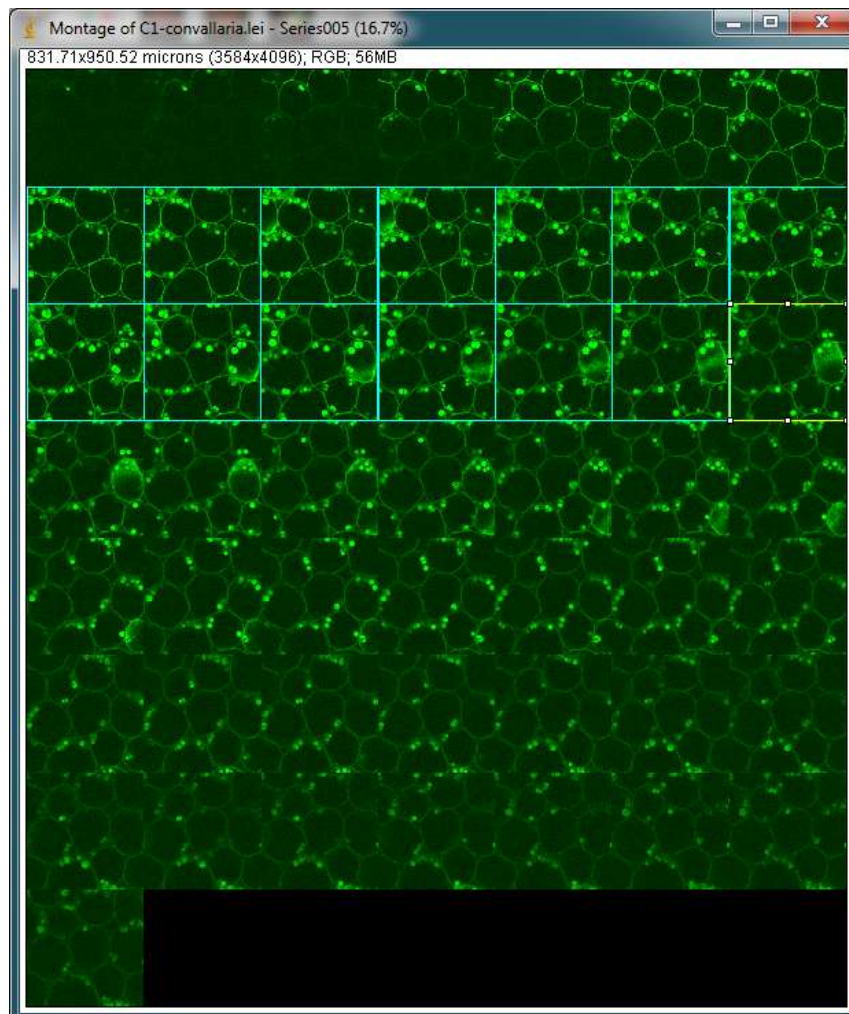
Marcar Paneles. Para marcar varios paneles seleccionaremos, en la imagen del montaje, el primer panel a seleccionar y pulsamos en este botón. Se nos abrirá la ventana del ROI Manager en la que aparecerá la referencia del primer panel seleccionado. A continuación marcamos el siguiente panel y pulsamos el botón “add” en el ROI Manager para añadirlo a la lista de paneles, de este modo iremos seleccionando los paneles a marcar. Cada panel marcado aparecerá con un recuadro azul.





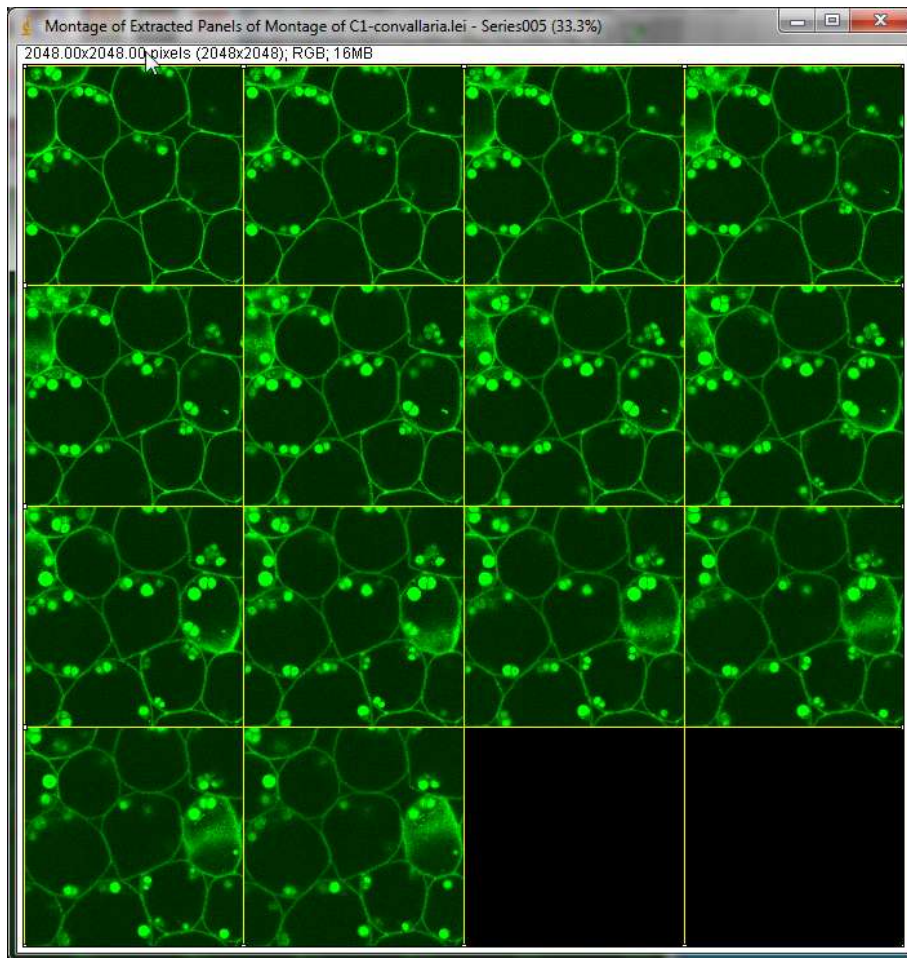
Extraer Paneles Marcados. Pulsando en este botón extrae los paneles marcados a una nueva imagen en forma de stack. Las imágenes en el stack aparecen en el orden en que seleccionamos los paneles.

Los dos botones anteriores nos permiten extraer en una serie de imágenes (stack) aquellas secciones que nos interesan para crear una nueva serie.

Si tenemos el siguiente montaje de una serie de imágenes de Microscopía Confocal y nos interesa extraer las secciones 8 a la 21 haremos lo siguiente:



Seleccionamos las imágenes que deseamos con el botón Marcar Paneles, pulsamos en el botón Extraer Paneles Marcados y obtendremos una nueva serie con las imágenes seleccionadas que podemos visualizar como un nuevo montaje pulsando el icono   montaje

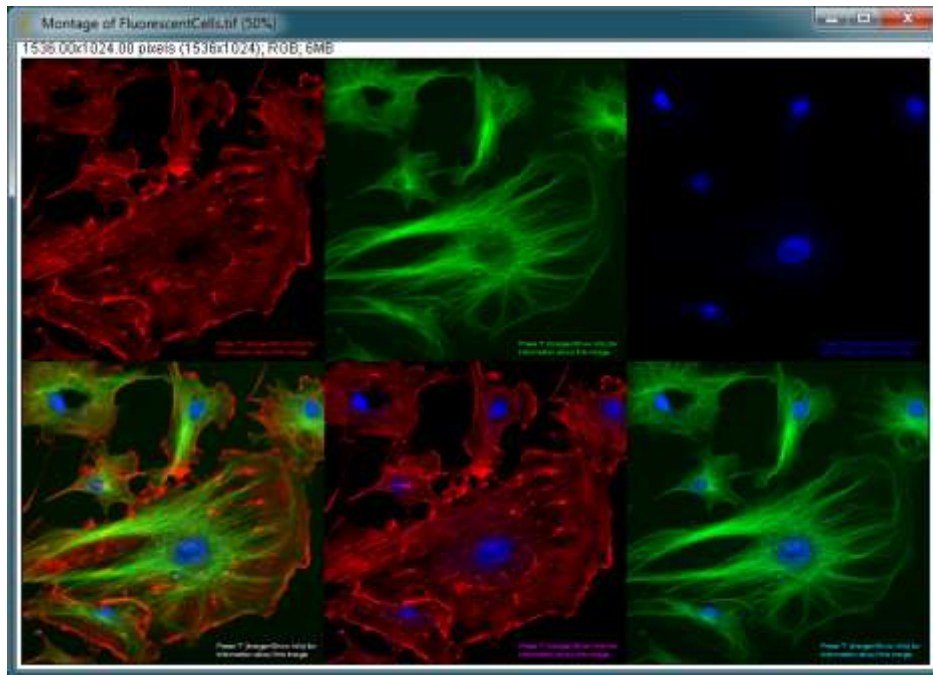


C **Copiar.** Copia al portapapeles el panel seleccionado. (tecla de acceso rápido c)

P **Pegar.** Pega el contenido del portapapeles en el panel seleccionado (tecla de acceso rápido v)

Cuando trabajamos con imágenes de varios canales (por ejemplo varios marcadores fluorescentes) podemos copiar la imagen de un canal y pegarla en el panel donde se representa otro canal. La resultante será la suma de ambos canales.

Con estos dos botones podemos hacer montajes de marcadores fluorescentes “a la carta”, representando cada marcador por separado, los marcadores dos a dos y la suma de todos los marcadores, como aparece en la imagen siguiente:



Pegar contenido del portapapeles en un panel. Pega el contenido del portapapeles en el panel seleccionado en el montaje. El contenido del portapapeles puede ser una imagen del propio montaje o cualquier otra imagen que hayamos abierto con ImageJ y la hayamos copiado al portapapeles.






Borrar panel seleccionado. Borra el contenido del panel que previamente hayamos seleccionado

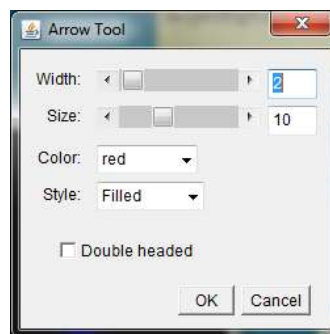
La aplicación de montaje no tiene opción de deshacer por lo que cualquier operación que realizamos no tiene vuelta atrás.



Las anteriores opciones del panel de montaje nos permiten manipular las imágenes del panel. Las opciones que se describen a continuación nos van a permitir realizar dibujos y anotaciones sobre el panel de imágenes. Los dibujos y anotaciones se realizan en “overlay” sin alterar el contenido de la imagen que hay debajo.

Para dibujar debemos seguir el siguiente proceso:

- Elegir las opciones de la herramienta que deseamos utilizar
- Seleccionar la herramienta de dibujo y dibujar sobre el panel
- Añadir el dibujo al Overlay pulsando el icono  de herramientas de "Overlay".

Así, para marcar con una flecha un elemento de una imagen iremos a las opciones de flecha y definiremos el formato de la flecha.



A continuación seleccionaremos la herramienta flecha  y dibujamos la flecha, finalmente para fijarla en la posición deseada pulsamos el icono .

Herramientas de "Dibujo"



Flecha. Dibuja una flecha en el panel seleccionado



Flechas sincronizadas. Si previamente hemos dibujado una flecha en uno de los

paneles, al pulsar en este icono nos copia la flecha en todos los paneles del montaje.



Cruces sincronizadas. Marca una cruz en cada uno de los paneles del montaje.



Anotar. Esta herramienta permite asignar una letra a cada uno de los paneles del montaje.



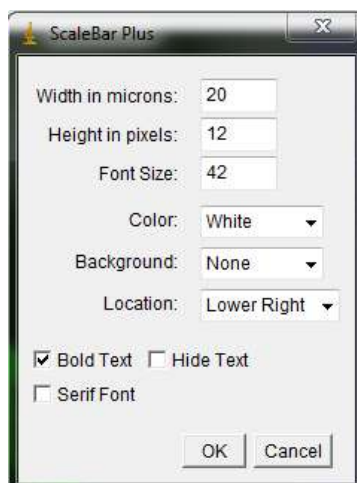
Texto. Permite escribir texto sobre los paneles de la imagen.



Añadir bordes. Dibuja los bordes de los paneles del montaje. Si previamente no hemos seleccionado las opciones de bordes nos dará un error.



Añadir barra de escala. Permite añadir una barra de escala al montaje. Las imágenes del montaje deben de estar calibradas para que la barra de escala aparezca en unidades reales (micras, mm). En el menú "Scale Bar" seleccionaremos el tamaño de la escala y su posición en el panel.



La opción de barra de escala es la única que se dibuja sobre el montaje de la imagen y no sobre el "overlay". Una vez que la hayamos dibujado no podremos eliminarla, salvo que borremos el panel sobre el que se encuentra.

Herramientas de "Opciones"



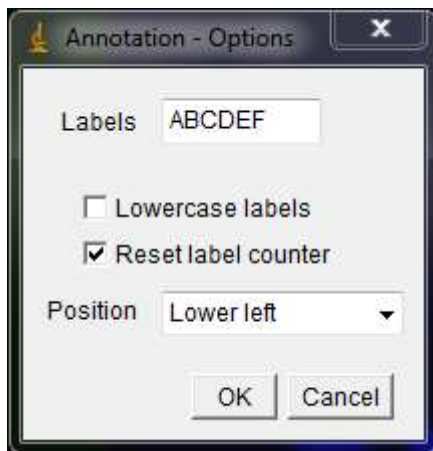
Opciones de flecha.



Tipo de fuente. Determina la fuente de texto utilizada en las herramientas "anotar" y "texto".



Opción de anotación. En el menú de opciones de anotación definiremos las letras que vamos a usar para anotar cada panel, así como la posición en la que se colocarán.



Opciones de bordes. Permite elegir el color y el grosor utilizados en la herramienta “añadir bordes”.



Definir tamaño de selección. Esta herramienta permite cambiar el tamaño de selección de paneles.



El parámetro “Width” indica el número de paneles a lo ancho en los que se dividirá nuestro montaje. El parámetro “Height” define el número de paneles a lo alto. Por ejemplo si tenemos un montaje de 4 imágenes (2 x 2) y definimos un tamaño de selección de “Width: 2” “Height: 2” cada imagen va a ser un panel. Si cambiamos el tamaño de selección y ponemos “Width=1” “Height=2” tendremos un montaje con únicamente 2 paneles, uno arriba y otro abajo. Cada panel ocupará dos imágenes.

Las herramientas de “Overlay” son:



Añade el dibujo al “Overlay”.



Borra el “Overlay”.

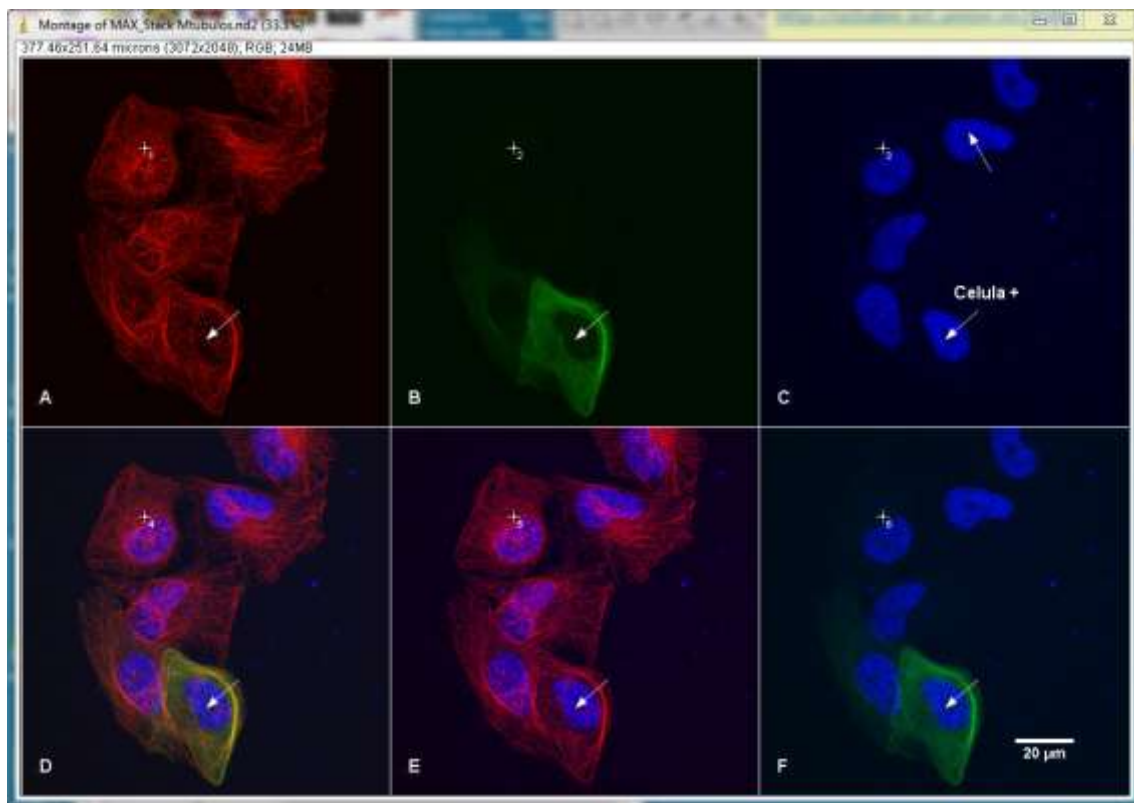


Ocultar el “Overlay”.



Muestra el “Overlay”.

Con la utilización de las opciones vista anteriormente podemos realizar montajes como el siguiente:



IJ

Pulsando este icono desaparece el menú general de ImageJ y sólo queda en pantalla el menú que contiene las funciones de ConfocalUniovi ImageJ.

Si queremos volver a activar el menú general de ImageJ pulsaremos de nuevo en el icono.

Referencias:

1. W.S. Rasband. "ImageJ". U.S. National Institute of Health., MD (1997-2010).
<http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
2. Melissa Linkert, Curtis T. Rueden, Chris Allan, Jean-Marie Burel, Will Moore, Andrew Patterson, Brian Loranger, Josh Moore, Carlos Neves, Donald MacDonald, Aleksandra Tarkowska, Caitlin Sticco, Emma Hill, Mike Rossner, Kevin W. Eliceiri, and Jason R. Swedlow (2010) Metadata matters: access to image data in the real world. The Journal of Cell Biology, Vol. 189no. 5777-782
doi: 10.1083/jcb.201004104
3. Benjamin Schmid, Johannes Schindelin, Albert Cardona, Mark Longair and Martin Heisenberg. A high-level 3D visualization API for Java and ImageJ. *BMC Bioinformatics* 2010, **11**:274.
4. S. Preibisch, S. Saalfeld, P. Tomancak (2009) Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions", *Bioinformatics*, **25**(11):1463-1465.